

Vol. XI, No. 1.

1930

~~1929~~

QP
501
J67

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

11 Ichome Kagacho, Ushigome.

Price { ¥10.00 per volume, Nippon.
\$ 5.50 per volume, other countries.



THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Nagoya; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIVOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XI

TOKYO

1930

COPYRIGHT 1930

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME XI.

No. 1, July, 1929

	Page
IMAZU, Tsunamoto. Experimentelle Untersuchungen über die Glykogenbildung in der Leber mittels Durchblutungsversuche bei künstlich hervorgerufenem Fieber	1
EDA, Genichiro. Einfluss des Ergotamins auf die Zuckerausscheidungs- schwelle	12
SUGINO, Ryuzo. The effect of the addition of proteins on the surface tension of the solution containing surface active acid or base	31
SENSHU, Judo. Some investigations on the question of the origin of plasma proteins. I. The action of various tissues on serum proteins ..	47
SENSHU, Judo. Some investigations on the question of the origin of plasma proteins. II. The relation of hyperalbuminemic and hyper- globulinemic condition to the action of liver and muscle on serum proteins	55
SENSHU, Judo. Some investigations on the question of the origin of plasma proteins. III. The nitrogen and sulphur content of liver and muscle in hyperalbuminemic and hyperglobulinemic condition	65
HARA, Kazuo. Beitrag zur Untersuchung der hämolytischen Wirkung des Saponins	69
WATANABE, Kazuo. Über das Verhalten des Glukoseureids im Tier- körper, unter besonderer Berücksichtigung des Blutzuckers	79
OKAMURA, Takeji. Über die Bufodesoxycholsäure (III)	103
ITO, Mitsuji. Studies on enzyme substance contained in Koji made of rice in different degrees of its polishing	111
ASAKAWA, Katsura. Über die fermentative Spaltung der verschiedenen Phosphorsäureester	143
KOBAYASHI, Hideo. Die fermentative Spaltung der Diphospho- glycerinsäure	173
OKUDA, Mizuho. Über den Gehalt an Glutathion in den denervierten Skelettmuskeln	183
NAGAYAMA, Takeyoshi and MUNEHISA, Tasuku. Studies in experi- mental scurvy. IV. The calcium and phosphorus metabolism of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet	201

No. 2, October, 1929

KAZIRO, Koozoo und TAKU, Aijiro. Über den Einfluss des Adrenalins und der Cholsäure auf die Kreatininausscheidung	203
MATSUMORI, Tsuneo. Über die Verbreitung des Glykogens im Rinder-	

herzen	219
NAGAYAMA, Takeyoshi and TAGAYA, Tatsumi. Studies in experimental scurvy. V. The lipid metabolism of the guinea pigs fed on a vitamin C free diet	225
IGARASHI, Eikichi and TAGAYA, Tatsumi. Studies in experimental scurvy. VI. On the amounts of unknown unsaponifiable substance and cholesterol in organ tissues of guinea pigs fed on a vitamin C free diet	239
SEKITO, Tadao. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Salzausscheidung im Harn	251
KITAGAWA, Matsunosuke and TOMIYAMA, Tetsuo. A new amino-compound in the jack bean and a corresponding new ferment. (I)	265
HATAKEYAMA, Takuichi. Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. VII. Der Gaswechsel des Kaninchens bei Zufuhr von Gallensäuren	273
OKAMURA, Shunzoo. Kreatininausscheidung bei experimentellen Stauungsikterus	285
KAWASHIMA, Shin-ichi und IWANAGA, Yoshio. Über den Einfluss der Vago-Splanchnicotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle	293
NOSHI, Katsumasa. Studien über die Milchsäure im Blute. I. Mitteilung. Über den Ruhewert und die Verteilung der Milchsäure im Blute	307
NOSHI, Katsumasa. Studien über die Milchsäure im Blute. II. Mitteilung. Über das Permeabilitätsproblem der Blutkörperchen gegen <i>dl</i> -, <i>d</i> - und <i>l</i> -Milchsäure	321

No. 3, January, 1930

KAZIRO, Koozoo und TSUJI, Kenji. Beiträge zur Pankreaslipase fördernden Wirkung der Gallensäure und zu ihrer hämolytischen Wirkung	333
SHINODA, Osamu. Contributions to the knowledge of intestinal secretion in insects. III. On the digestive enzymes of the silkworm	345
HEKI, Mutsuo. On anemic lipemia	369
SEKITO, Tadao. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel	391
MATSUMORI, Tsuneo und OKUDA, Mizuho. Über den Glutathiongehalt des Muskels, bezw. der anderen Organe und Gewebe, besonders beim Kaninchen	407
AKAGI, Shirozo. Über die Bestimmung der relativen Viskosität mit dem Ubbelohde-Viskosimeter	415
AKAGI, Shirozo. Die Abhängigkeit der Viskosität einiger Eiweißlösungen von der Temperatur	423
SAGARA, Jun-ichiro. Zur Kenntnis der Ornithursäurebildung im Hühnerorganismus	427

Contents.

v

SAGARA, Jun-ichiro. Über das Verhalten des gebundenen Zuckers bei Bebrütung von Hühnereiern	433
TAKAHASHI, Masao. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. V. Über das Verhalten des Chinaldins im Organismus des Kaninchens und des Huhns	441
TAKAHASHI, Masao. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. VI. Über das Verhalten der Nitrozimtsäure im Tierorganismus	445
NAGAYAMA, Takeyoshi and TAGAYA, Tatsumi. Studies in experi- mental scurvy. VII. The effect of a Vitamin C given parenterally to guinea pigs fed on a Vitamin C free diet	449
KOGA, Yoshiyuki. Studies in experimental scurvy. VIII. Contribution to the study on the carbohydrate metabolism of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet	461
YASUDA, Morio. Über den Einfluss des Sekretions auf den Blutzucker- gehalt	479

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GLYKOGENBILDUNG IN DER LEBER MITTELS DURCHBLUTUNGSVERSUCHE BEI KÜNSTLICH HERVORGERUFENEM FIEBER.

VON

TSUNAMOTO IMAZU.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. R. Inada Kaiserliche
Universität zu Tokyo.)*

(Eingegangen am 24. April 1929.)

Bekanntlich wird die Zuckerassimilation bei den verschiedenen fieberhaften Krankheiten mehr oder minder gestört und oft eine Hyperglykämie auch im nüchternen Zustande beobachtet. Aber die Ansichten der Autoren in Bezug auf den Mechanismus dieser Zusammenhänge gehen auseinander. Neuerdings zitiert Geiger (1927) in seiner Arbeit drei Ansichten von früheren Autoren, dass Liefmann und Stern (1906) die Ursache der Hyperglykämie in der Steigerung des Stoffwechsels durch das Fieber und Masing (1912), Rolly und Oppermann (1913) in der Hyperthermie selbst sehen, während Watanabe und Sakaguchi (1914) einen direkten Zusammenhang zwischen Fieberhyperglykämie und vermehrter Kohlehydratverbrennung oder Hyperthermie ablehnen und annehmen wollen, dass die pyrogene Substanz zur toxischen Erregung des Zuckerzentrums führt. Weil Geiger bei seiner Untersuchung die Hyperglykämie nur im Stadium des Fieberanstiegs sah, verneint er alle oben genannten Ansichten und glaubt, die Fieberhyperglykämie als eine durch relative Unterkühlung hervorgerufene Art der "Unterkühlungshyperglykämie" erklären zu können. Aber dagegen spricht der Befund, dass Watanabe und Sakaguchi in einem Fall von kruppöser Pneumonie fünf Tage nach der Krisis bei normaler Körpertemperatur einen erhöhten Nüchternblutzuckergehalt beobachteten und dass Asakawa (1921)

in unserer Klinik häufig am Ende des Fieberstadiums oder nach der Entfieberung eine stärker ausgeprägte Störung der Zuckerassimilation beobachtete als im Akmestadium. Freund (1921) ist auch der Meinung, dass die Höhe des Blutzuckers keineswegs von der Höhe der Fiebertemperatur, sondern nur von der Schwere der Intoxikation, und zwar besonders der infektiösen Schädigung der Leber abhängt.

Obwohl die Meinungen der Autoren, wie oben erwähnt, nicht ganz übereinstimmen, so wird doch im allgemeinen anerkannt, dass die Zuckermobilisation in der Leber im Fieber gesteigert und die Glykogenstapelung vermindert ist. Auch experimentell wurde der Leberglykogenschwund beim Fieber von vielen Seiten (Senator, Kraus, Rolly u.a.) festgestellt.

Aber meines Wissens fehlt es noch an Angaben über experimentelle Untersuchungen, welche in direkter Weise die Verminderung der glykogenbildenden Fähigkeit der Leber im Fieber beweisen. Ich habe mich also auf Anraten und unter der Leitung von Prof. R. Inada und Prof. K. Sakaguchi mit dieser Frage befasst, indem ich dabei Durchblutungsversuche der Leber ausführte.

Bei meinen Untersuchungen ging ich so vor, dass ich durch subcutane resp. intravenöse Zufuhr von Typhus- und Dysenterie (Shiga)-Vaccin oder von Tetrahydro- β -naphthylamin beim Hunde eine Temperatursteigerung hervorrief, welche eine deutliche Herabsetzung der Zuckerassimilationsfähigkeit nach sich zog, was ich auch selbst experimentell bestätigen konnte, und dass ich die Glykogenbildung in der Leber der so behandelten Tiere beim Durchblutungsversuche untersuchte.

A. DER EINFLUSS DER FIEBERSTEIGERUNG AUF DIE ZUCKERASSIMILATION.

1. *Untersuchung am kohlehydratreich genährten Hunde.*

Bevor ich zu den eigentlichen Durchblutungsversuchen überging, untersuchte ich zuerst, wie stark die Zuckerassimilations-

TABELLE I.

Hunde-Nr. Körpergewicht	Datum 1926	Blutzuckergehalt vor dem Versuche (%) (Körper- temperatur) (C)	Pyrogene Substanz	Glukose pro. Kg. Körpergewicht (g)	Blutzuckergehalt nach Zuckerzufuhr (%) (Körpertemperatur C)				
					½ Std.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	3 Std.
1) VIII (9. Kg)	26. VII.	0.081		3	0.113	0.107	0.097	0.083	
	4. IX.	0.077		3	0.104	0.106	0.085	0.088	
	11. IX.	0.077 (39.4)	Typhus Vaccin 1 cem. intrav.	3	0.139 (40.9)	0.117 (40.6)	0.100 (40.5)	0.085 (40.0)	0.081 (39.1)
2) IV (11.95)	20. IX.	0.103 (38.5)		3	0.127 (38.5)	0.133	0.122 (38.5)	0.127 (38.6)	
	24. IX.	0.093 (38.9)	Typhus Vaccin 1 cem. intrav.	3	0.144 (40.0)	0.139 (39.3)	0.118 (39.1)	0.112 (38.9)	0.123 (38.9)
3) V (11.2)	15. IX.	0.07 (38.6)		3	0.109	0.107 (38.3)	0.081 (38.2)	0.078	0.070
	19. IX.	0.074 (38.5)	Typhus Vaccin 2 cem. intrav.	3	0.096 (38.9)	0.096 (39.1)	0.095 (39.3)	0.072 (39.4)	0.075 (39.3)
	25. IX.	0.077 (38.5)	Typhus Vaccin 4 cem. intrav.	3	0.116 (39.1)	0.084 (39.2)	0.080 (39.8)	0.072 (39.7)	0.075 (39.4)
4) VIII (11. Kg)	21. X.	0.089 (39.1)		4	0.088 (38.9)	0.101 (39.1)	0.097 (39.1)	0.099 (39.3)	0.087 (39.2)
	8. XI.	0.089 (39.1)		4	0.083 (39.1)	0.104 (39.4)	0.085 (39.2)	0.095 (39.3)	
	14. XI.	0.104 (37.8)	Shiga- Vaccin 1 cem. intrav.	4	0.137 (39.0)	0.119 (39.0)			
5) XII (10. Kg)	23. I. 1927	0.107		3	0.135	0.112	0.115	0.108	0.090
	24. I. 1927	0.093 (38.9)	Tetra- hydro-β- Naphthyl- amin 1 cem. Subeutan	3	0.162 (41.6)	0.149 (41.5)	0.143 (40.6)	0.137 (40.1)	0.119

fähigkeit durch die oben genannten Substanzen beeinflusst wird. Dazu habe ich den in normaler Weise kohlehydratreich genährten Hunden pro Kilo Körpergewicht 3–4 g Glukose in 200 ccm Wasser gelöst mittels des Gummischlauches direkt in den Magen eingeführt und dann den Blutzuckergehalt halbstündlich zwei resp. drei Stunden lang mit Bangscher Methode bestimmt, um in anderer Reihe den Einfluss der pyrogenen Stoffe auf diese alimentäre Hyperglykämie zu untersuchen, indem hier der Zucker erst dem Fieberanstieg von über 1°C verabreicht wurde. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle I. angegeben.

Aus der Tabelle kann man ersehen, dass die Hyperglykämie bei Versuchen mit Fiebersteigerung als Regel in gewissem Masse stärker zustande kam, als bei den Kontrollversuchen.

II. Untersuchungen am Hunde mit Eiweiss-Fett-Diät.

Die Schädigung der Zuckerassimilation durch pyrogene Substanzen war bei den vorangehenden Versuchen relativ geringgradig, obwohl sie unverkennbar in Erscheinung trat. Da Prof. Sakaguchi aus äusseren Gründen vermutete, dass die Empfindlichkeit des Organismus gegen pyrogene Stoffe durch die Ernährungsweise beeinflusst werden würde, so habe ich die im vorigen Kapitel erwähnten Versuche nochmals an mit Eiweiss-Fett-Kost genährten Tieren ausgeführt.

Weil Kageura (1924) in unserer Klinik feststellte, dass zwei Tage lang fortgesetzte Eiweiss-Fett-Kost die Assimilationskraft des gesunden Hundes für Kohlehydrate deutlich herabsetzt, habe ich zuerst unter dieser Bedingung die Assimilationsfähigkeit der Versuchstiere bestimmt, indem ich 3 g Traubenzucker pro Kilo Körpergewicht in den Magen einführte. Nachdem die Zuckerassimilationskraft der Tiere nach den darauf folgenden kohlehydratreichen Tagen wieder in normalen Zustand zurückgekehrt war, habe ich die Versuche unter dem Gebrauch von pyrogenem Typhusvaccin wiederholt.

TABELLE II.

Hunde-Nr. Körpergewicht	Datum 1926 Diät	Blutzuckergehalt vor dem Versuche (%) (Körpertemperatur)	Typhusvaccin (intravenös zugeführt)	Glukose pro Kg. Körpergewicht (g)	Blutzuckergehalt nach Zuckerzufuhr (%) (Körpertemperatur °C)				
					½ Std.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.	3 Std.
I (9.0 Kg)	16. VI. Eiweiss- Fett- Diät	0.090 (38.8)		3	0.153	0.137	0.158	0.142	0.082 (38.6)
	16. VI. Eiweiss- Fett- Diät	0.098 (39.7)	1 ccm.	3	0.176	0.237 (40.3)	0.207 (40.5)	0.160 (40.5)	0.112 (40.3)
II (10 Kg)	16. VI. Eiweiss- Fett- Diät	0.094 (39.1)		3	0.125		0.121	0.105	0.109 (39.2)
	26. VI. Eiweiss- Fett- Diät	0.117 (39.3)	1 ccm.	3	0.263	0.240 (40.9)	0.171 (40.4)	0.196 (41.0)	0.168 (40.4)

Wenn man die hier am kohlehydratarm genährten Tiere ermittelten Untersuchungsergebnisse mit der Tabelle I. (Versuche am kohlehydratreich genährten Tiere) in Vergleich stellt, so wird man finden, dass die Störung der Zuckerassimilation durch pyrogene Substanz beim ersteren unverkennbar deutlicher in die Erscheinung tritt als bei dem letzteren.

B) GLYKOGENBILDUNG IN DER LEBER DES FIEBERNDEN TIERES.

Bei diesen Untersuchungen ging ich so vor, dass das aus der Carotis des Versuchstieres zum Verbluten gelassene Blut in einem Gefäß gesammelt, und mit einer frisch dargestellten glukosereichen Barrenscheenschen Lösung vermischt wurde, um die inzwischen herausgeschnittene Leber damit durchströmen zu lassen. Vor der Durchblutung wurde ein Leberläppchen zur Kontrollbestimmung des Glykogengehaltes abgetragen.

Der übrige Leberteil wurde bei 38°–40°C. 15 Minuten lang nach Yamakawa durchblutet. Dann wurde der Glykogengehalt der so behandelten Leber wieder bestimmt. Zur Glykogenbestimmung wurde hier die Mori-Iwasakische Methode angewandt. Bevor ich zu den eigentlichen Versuchen am fiebernden Tiere übergang, stellte ich zuerst als Kontrolle einige Versuche am gesunden Hunde an. Die Resultate der letzteren sind in der Tabelle III. wiedergegeben.

TABELLE III.

Nr. des Hundes (Körpergewicht)	Datum 1927	Körpertemperatur		Gewicht der Leber (g)	Glykogen der Leber			
							Zunahme	
					%	(g)	(g)	%
••XVII (15.1 Kg)	28. III.	39.2°C	vor } der Durchblutung nach	235	7.9	18.56	24.0	129.0
				665	6.4	42.56		
XX (13.3 Kg)	22. III.	38.6°C	vor } der Durchblutung nach	285	3.0	8.55	8.19	95.7
				620	2.7	16.74		
					durchschnittliche Zunahme	112.3 %		

Wie die Tabelle zeigt, war die Glykogenzunahme bei meinen Versuchen an zwei normalen Hunden 129 und 95.7%, im Mittel 112.3%. Hier sei erwähnt, dass Kageura (1924) in unserem Laboratorium unter gleichen Bedingungen eine Zunahme von 97–192% mit einem Durchschnittswert von 128%, und neulich Iwasawa (1927) auch in hiesiger Klinik eine Steigerung von 91–128%, durchschnittlich 111%, beobachtete. Weil die Befunde dieser Autoren mit den meinigen gut übereinstimmten, so hielt ich es für zwecklos, meine Kontrollversuche weiter auf breiterer Basis auszuführen.

Bei dieser Sachlage kann man m.E. ganz ruhig annehmen,

dass die Glykogenzunahme der Leber unter den vorliegenden Bedingungen beim normalen Hunde um 110–120% mit einer Variationsbreite von 95 bis 190% beträgt.

Nun wurde derselbe Versuch zunächst am fiebernden Hunde wiederholt, nachdem die Körpertemperatur des Tieres durch subcutane oder intravenöse Zufuhr von Dysenterie (Shigabacillen)- oder Typhus-Vaccin resp. Tetrahydro- β -Naphthylamin 1°–4° C. anstieg war.

Die einzelnen Daten sind in der Tabelle IV. verzeichnet.

Wie aus der Tabelle leicht ersichtlich ist, war die Steigerung des Leberglykogengehaltes bei fiebernden Tieren im allgemeinen auffallend geringfügig. Unter zehn Versuchen wurde die Zunahme nur zweimal—im ersten und vierten Versuche (Hunde Nr. 3 und Nr. 7)—kaum normal gross (80.3% und 93.1%) gefunden; in allen übrigen Fällen war sie kleiner, sodass sie unterhalb von 68.9% blieb, ja sogar in den letzten zwei Fällen eine Abnahme von 19.2% und 57.7% beobachtet wurde.

Hier sei bemerkt, dass die Glykogenbildung der Leber bei meinen Versuchen durch Tetrahydro- β -Naphthylamin stärker gestört war als durch Vaccine. Sie ist höchst wahrscheinlich auf die periphere sympathisch erregende Wirkung des Tetrahydro- β -Naphthylamins zurückzuführen, die nach dem Ausschneiden der Leber noch weiter wirkt. Durch diese Versuche wurde es direkt bewiesen, dass die Glykogenbildung der Leber beim fiebernden Tiere deutlich herabgesetzt ist, und dass diese Herabsetzung auf die Insuffizienz der Funktion der Leberzellen selbst zurückzuführen ist.

Seit langem nimmt man an, dass die Glykogenolyse im Fieberzustande durch die zentrale sympathische Erregung vom Zwischenhirn stärker ausgelöst werde, wobei die Leber das Glykogen zu speichern nicht im Stande ist.

Das kann wohl vorkommen. Aber wenigstens ist es aus meinen Versuchen klar, dass die Funktionsschwäche der Leberzellen eine gross Rolle bei diesem Vorgang spielt. Es bliebe noch übrig zu versuchen, die Leber des fiebernden Tieres mit dem

TABELLE IV.

Hunde-Nr. (Körper- gewicht) (Kg)	Datum	Blutzucker- gehalt vor dem Versuche (%) (Körper- temp. C)	Pyrogene Substanz	Std. n.d. Injection Blutzucker- gehalt % (Körpertemp. C)	Durch- blutung	Gewicht d. Leber (g)	Glykogeengehalt der Leber			
							(g)	(g)	(g)	Zunahme (%)
1) III (9.0)	18. IX. 1926	0.07 (39.1)	Typhus- vaccin 1 cem. intra- venös	1/2 0.101 (39.2)	1 0.096 (40.1)	vor nach	320 544	0.67 0.71	1.72 3.86	80.3
2) IV (10.7)	9. X.	0.074 (38.2)	Typhus- vaccin 1 cem. intra- venös	2/3 0.103 (39.3)	1 0.104 (41.5)	vor nach	356 605	2.56 2.24	9.16 13.55	47.9
3) V (11.6)	13. X.	0.078 (38.8)	Typhus- vaccin 1 cem. intra- venös	1 0.082 (39.0)	2 1/2 0.100 (39.9)	vor nach	528 810	8.3 8.3	43.82 67.23	53.0
4) VII (12.3)	20. XII.	0.100 (38.3)	Shiga- vaccin 1 cem. subc.	1 0.09 (38.4)	2 0.10 (39.4)	vor nach	380 580	4.9 6.2	18.62 35.96	93.1
5) VIII (13.0)	30. XII.	0.090 (39.3)	Shiga- vaccin 1 cem. intra- venös	1 0.084 (39.8)	2 0.096 (40.8)	vor nach	309 550	1.29 1.07	3.98 5.88	47.7

6)	X	10. I. 1927	0.098 (39.1)	<i>Shiga-</i> vaccin 1 cem. intra- venös	1 2 3 0.092 0.087 (39.4) (39.7) (40.0)	vor nach	410 675	0.87 0.74	3.57 4.99	1.42 39.5
7)	XI	21. I. 1927	0.096 (39.1)	Tetra- hydro- β - Naphthyl- amin 0.25 cem. subc.	1 2 $\frac{3}{4}$ 0.094 0.133 (39.3) (40.6)	vor nach	265 403	0.55 0.61	1.45 2.45	68.9
8)	IX	27. I. 1927	0.087 (37.2)	Tetra- hydro- β - Naphthyl- amin 0.4 cem. subc.	1 2 $\frac{1}{3}$ 0.103 0.113 (41.6) (41.3)	vor nach	345 727	8.4 5.5	28.9 39.8	37.7
9)	XII	1. II. 1927	0.099 (38.9)	Tetra- hydro- β - Naphthyl- amin 0.25 cem. subc.	1 1 $\frac{1}{2}$ 3 $\frac{1}{2}$ 0.098 0.104 0.097 (39.4) (39.9) (41.3)	vor nach	239 440	10.9 2.5	26.05 11.0	-57.7
10)	XV	12. III. 1927	0.092 (39.2)	Tetra- hydro- β - Naphthyl- amin 0.3 cem. subc.	2/3 1 2 0.077 0.104 (38.9) (40.6) (41.5)	vor nach	385 600	1.66 0.86	6.39 5.16	-1.23 -19.2

Blute des gesunden Tieres und umgekehrt zu durchbluten, was noch Genaueres ergeben könnte.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Assimilationskraft für Zucker des normal genährten Hundes wird bei einem durch Typhus- oder Dysenterie-Vaccin oder Tetrahydro- β -Naphthylamin erzeugten Fieber regelmässig in gewissem Grade gestört.

2. Die Störung der Zuckerassimilation beim künstlich hervorgerufenen Fieber tritt bei den mit Eiweiss-Fett-Kost gefütterten Kohlehydratkarenzhunden unverkennbar deutlicher in die Erscheinung als bei kohlehydratreich genährten Tieren.

3. Bei der Durchblutung der Leber mit einer glukosereichen Lösung war die Glykogenbildung beim fiebernden Hunde auffallend kleiner als beim Normaltiere. Es fand sogar in zwei Fällen unter zehn eine Glykogenabnahme statt.

Es sei mir erlaubt, auch an dieser Stelle den Herren Prof. R. Inada und Prof. K. Sakaguchi für ihre Anregung und Leitung, sowie Herrn H. Iwasawa für seine freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Asakawa, O. (1921): Mitteil. aus d. Mediz. Fakultät d. Kaiserl. Universität zu Tokyo, **27**, 31; **25**, 495, 527.
Barrenscheen, H. K. (1913): Biochem. Zeitschr., **58**, 277.
Noorden, C. von (1927): Die Zuckerkrankheit und ihre Behandlung, VIII Auflage 40.
Freund u. Marchand (1913): Deutsch. Arch. f. Kl. Med., **110**, 121.
Freund (1921): Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk., **22**.
Geiger, E. (1927): Arch. f. exp. Pathol. und Pharm. **121**, 67.
Hollinger (1908): Deutsch. Arch. f. Kl. Med., **92**, 217.
Hirsch, C. und Müller, O.: Deutsch. Arch. f. Kl. Med. **75**, 275.
Iwasawa, H. (1927): Japan. Jour. of Med. Sciences., **1**.
Kageura, N. (1924): The Journal of Biochemistry, **3**.
Kuno (1911): Mitteil. aus d. Med. Fakultät d. Kaiserl. Universität zu Tokyo, **22**.

- Lepin u. Baulud (1911): Ref. im Zentralblatt f. Biochemie u. Biophysik.,
2, 933.
- Liefmann, E. u. Stern, R. (1906): Biochem. Zeitschrift. **1**, 299.
- Mori, T. u. Iwasaki, K.: Mitteil. d. Med. Gesellschaft zu Tokyo, **35**.
- Rolly und Oppermann (1913): Biochem. Zeitschrift., **48**, 200.
- Richter (1903): Berliner Klin. Wochenschr., **37**, 841.
- Senator (1909): Zeitschr. f. Klin. Med. **67**, 253.
- Watanabe, R. und Sakaguchi, K. (1914): Mitteil. aus d. Med.
 Fakultät d. Kaiserl. Universität zu Tokyo, **13**, 99.
- Yamakawa, I.: Mitteil. d. Med. Gesellschaft zu Tokyo, **32**, 862.

EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE ZUCKER- AUSSCHIEDUNGSSCHWELLE.

VON

GENICHIRO EDA.

(Aus der Medizinischen Klinik von Prof. Ryokichi Inada,
Kaiserliche Universität zu Tokio.)

(Eingegangen am 2. Mai 1929.)

Nach zahlreichen Untersuchungen in unserer Klinik (Nakayama 1924, Shim 1925, Kawashima 1927, 1928, Eda 1927, Kawashima und Iwanaga 1928) ist es zweifellos, dass die Zuckerausscheidungsschwelle mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in einem innigen Zusammenhang steht. Dabei haben zahlreiche Autoren gefunden, dass die Erhöhung der Schwelle gewöhnlich mit der Verschlimmerung der Zuckerassimilation parallel geht und soweit scheint es uns höchst wahrscheinlich, dass die Erregung des sympathischen Nervensystems eine Steigerung des Schwellenwertes verursacht. Bekanntlich wirkt Ergotamin sympathicuslähmend und ausserdem noch hemmend auf viele Arten von Hyperglykämie wie alimentäre, Adrenalin-, Coffein-, Diuretin-, Pilocarpin-, Pikrotoxin-, Salz-hyperglykämie und diejenige durch Antipyretika (Hetenyi 1926, Grunke 1926, Pollak 1927, Eda 1928). Bei solcher Sachlage dürfte es von Interesse sein, den Einfluss der durch Ergotamin hervorgerufenen Sympathicuslähmung auf den Schwellenwert zu untersuchen. So habe ich auf Veranlassung und unter der Leitung von Prof. R. Inada und Prof. K. Sakaguchi mich mit dieser Frage beschäftigt.

Wenn unsere Vermutung zutrifft, dass Sympathicotonie eine Erhöhung des Schwellenwertes nach sich zieht, sollte Ergotamin auf ihn herabsetzend einwirken. Aber hier ist der Gedanke von vornherein naheliegend, dass diese Wirkung entsprechend den einwirkenden Umständen verschieden ausfällt, je nachdem die

Schwelle im betreffenden Falle normal liegt oder übernormal erhöht ist. Weil der Organismus bestrebt ist, den normalen Zustand möglichst aufrecht zu erhalten, so sollte die Ergotaminwirkung hier stärker als dort in die Erscheinung treten, wie Antipyretica bei erhöhter Körpertemperatur und Insulin bei gesteigertem Blutzuckergehalt ihre spezifische Wirkung deutlich entfalten, während sie bei Organismen mit einem normalen oder subnormalen Wert ganz vermisst oder nur in geringerem Grade beobachtet wird. Bei meinen Versuchen habe ich dementsprechend einmal an Diabetikern und ein anderes Mal an Hunden mit einer durch Eiweiss-Fett-Kost künstlich gesteigerten Zuckerausscheidungsschwelle (Nakayama 1924) die Ergotaminwirkung untersucht.

VERSUCHE AN DIABETIKERN.

Zum Zwecke der Bestimmung der Zuckerausscheidungsschwelle wurde dem Kranken soviel Kohlehydrat in der Form von gekochtem Reis mit zwei Hühnereiern verabreicht, dass die Glykosurie nur in Spuren auftrat. Der Blutzucker wurde dabei drei Stunden lang mit einem Intervall von einer halben bis einer Stunde mittels der Bangschen Mikromethode bestimmt und der Harn stündlich auf den Zucker untersucht, damit der maximale Punkt der Blutzuckerkurve als der Schwellenwert geschätzt werden konnte. Bei meinen Untersuchungen kam es natürlich häufig vor, dass die Glykosurie stark positiv oder ganz negativ ausfiel. Untersuchungsergebnisse, welche für die Schwellenbestimmung nicht taugen, sind aber in allen Tabellen weggelassen. Bei Ergotaminversuchen wurde 0.3 bis 0.5 mg Ergotamin (Gynergen-Sandoz) $\frac{1}{4}$ Stunde vor der Nahrungszufuhr oder auf zwei Male verteilt zum zweiten Mal $1\frac{1}{2}$ Stunde nach dem Essen subkutan injiziert.

Fall 1. S. M. 52 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, zeigen die Untersuchungen am 26. und 28. Juli wie am 1. August, dass der Schwellenwert des Kranken

0.13%, also niedriger als gewöhnlich ist. Bei Ergotaminversuchen findet man die alimentäre Hyperglykämie trotz der leichten Vergrößerung der Kohlehydratzufuhr etwas geringer als in Kontrollversuchen, und der Schwellenwert betrug hier 0.12%.

TABELLE I.

Datum 1927	KH- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)						Schwellen- wert %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	
26. VII	54		112 (—)	115	120 (—)	128	118 (Spur)	115 (—)	} ca. 0.13
28. VII	„		104 (—)	125	136 (—)	119	108 (Spur)	109 (—)	
1. VIII	60	0.3	104 (—)	123	120 (—)	125	113 (Spur)	110 (—)	
5. VIII	54		105 (—)	132	127 (Spur)	115	103 (Spur)	105 (—)	0.13
6. VIII	60	0.5	99 (—)	118	122 (—)	120	101 (Spur)	107 (—)	0.12

Fall 2. T. I. 38 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

Im vorliegenden Fall betrug der Schwellenwert in Kontroll- wie in Ergotaminversuchen immer ca. 0.15%. Hier wurde die Schwelle durch Ergotamin demnach gar nicht beeinflusst, obwohl die alimentäre Hyperglykämie unverkennbar dadurch unterdrückt war. (Tabelle II.)

TABELLE II.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Schwellen- wert %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
3. VIII	24		132 (—)	131	155 (—)	154	165 (Spur)	160 (0.35)	135 (Spur)	} ca. 0.15
4. VIII	20		121 (—)	127	142 (—)	135	142 (—)	124 (—)		
6. VIII	24	0.5	125 (—)	116	120 (—)	115	107 (—)	151 (Spur)	126 (—)	
8. VIII	30	„	116 (—)	126	119 (—)	114	121 (—)	162 (0.45)	129 (Spur)	unter 0.16
11. VIII	27		128 (—)	145	150 (—)	153	150 (Spur)	139 (—)		0.15
12. VIII	33	0.5	131 (—)	125	120 (—)	126	131 (—)	157 (Spur)	121 (—)	0.15

Fall 3. G. S. 62 jähriger Mann. Diabetes mellitus mit arteriosklerotischer Schrumpfniere.

Bei diesem Kranken wurde der Schwellenwert bei Ergotaminversuchen etwas niedriger (0.17%) gefunden, als bei Kontrollversuchen (0.19%), wobei auch die alimentäre Hyperglykämie dementsprechend durch das Gift unterdrückt wurde. (Tabelle III.)

TABELLE III.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Schwellen- wert %
			vor	1/2 Std.	1	1 1/2	2	3	4	
19. IX	41		97 (—)	156	188 (—)	171	157 (Spur)	93 (—)		ca. 0.19
23. IX	50	0.5	93 (—)	121	133 (—)	177	144 (Spur)	108 (—)		0.17
24. IX	51	„	100 (—)	123	126 (—)	153	174 (—)	121 (Spur)	(—)	0.17
27. IX	50		93 (—)	170	194 (—)	169	167 (Spur)	95 (—)		0.19

*Fall 4. S. F. 39 jähriger Mann. Leichter Diabetiker.
mit einer niedrigen Zuckerausscheidungsschwelle.*

Hier wirkte das Ergotamin auf die alimentäre Hyperglykämie ein wenig unterdrückend, sodass die Toleranz gegen Kohlehydrate dadurch etwas erhöht wurde. Der Schwellenwert wurde indessen hier durch das Gift gar nicht beeinflusst. Es sei hierbei bemerkt, dass die Zuckerausscheidungsschwelle des Kranken (0.12–0.13%) niedriger als gewöhnlich war. (Tabelle IV).

TABELLE IV.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)						Schwellen- wert %
			vor	1/2 Std.	1	1 1/2	2	3	
3. X	21		95 (—)	107	124 (—)	105	98 (Spur)	91 (—)	0.12
5. X	30	0.5 (auf 2 Male geteilt)	90 (—)	88	100 (—)	136	125 (Spur)	87 (—)	0.13
6. X	30	0.5	95 (—)	99	108 (—)	126	120 (Spur)	91 (—)	0.12
10. X	21		87 (—)	95	123 (—)	132	118 (Spur)	105 (—)	0.13

Fall 5. S. T. 39 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

Der Schwellenwert des Kranken war im gewöhnlichen Zustande 0.16–0.17% und bei Ergotaminversuchen etwa 0.15%. Weil bei allen Versuchen die gleiche Kost verabreicht wurde, so ergibt sich, dass die alimentäre Hyperglykämie hier genau so stark wie die Schwelle durch das Gift beeinflusst wurde. (Tabelle V.)

TABELLE V.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Schwellen- wert %
			vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	4	
1. XI	24		118	127	160	171	143	100		0.17
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)		
2. XI	24		105	113	143	166	151	121		0.16
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)		
7. XI	24	0.5	109	118	123	154	105	103		
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)		
9. XI	24	„	110	108	119	128	149	141	(—)	0.15
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(Spur)		
11. XI	24		103	131	131	169	173	147	(—)	
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(Spur)		
14. XI	24		105	128	146	167	160	130	(—)	0.17
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(Spur)		

Fall 6. T. Y. 40 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

Das Ergotamin wirkte hier toleranzerhöhend, aber der Schwellenwert wurde dadurch nicht beeinflusst, sodass er bei Kontroll- wie Ergotaminversuchen stets 0.16–0.17% betrug. (Tabelle VI.)

TABELLE VI.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)						Schwellen- wert %
			vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	
7. XII	54		100	125	138	163	151	125	
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)	
8. XII	54		98	131	146	169	143	119	0.16
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)	
10. XII	75	0.4	95	160	167	140	131	145	0.16
			(—)	(Spur)	(Spur)		(Spur)	(—)	
12. XII	75	„	98	163	150	138	128	136	0.16
			(—)	(Spur)	(Spur)		(—)	(—)	
14. XII	54		103	136	148	171	150	136	0.17
			(—)	(—)	(—)		(Spur)	(—)	

Fall 7. H. H. 50 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

In diesem Fall betrug der Schwellenwert im gewöhnlichen Zustande 0.17% und bei Ergotaminzufuhr 0.15%. Die alimentäre Hyperglykämie wurde durch das Gift ebenfalls etwas unterdrückt.

TABELLE VII.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Schwellen- wert %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
10. XII	75		99 (—)	134	166 (—)	135	114 (Spur)	96 (—)		0.17
11. XII	75		108 (—)	145	170 (—)	158	141 (Spur)	103 (—)		
12. XII	90	0.4	95 (—)	111	92 (—)	95	135 (—)	156 (Spur)	123 (—)	
13. XII	90	0.4	100 (—)	100	106 (—)	138	154 (—)	137 (Spur)	115 (—)	0.15
14. XII	75		103 (—)	155	176 (—)	150	151 (Spur)	90 (—)		

Fall 8. T. Y. 45 jähriger Mann. Diabetes mellitus.

Hier wirkte das Ergotamin auf die Toleranz für Kohlehydrate erhöhend, ohne den Schwellenwert herabzusetzen. Der letztere blieb stets 0.16–0.17%.

TABELLE VIII.

Datum 1927	KH g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Schwellen- wert %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
10. XII	51		112 (—)	138	170 (—)	153	161 (Spur)	139 (—)		0.17
11. XII	51		104 (—)	152	163 (—)	166	150 (Spur)	146 (—)		0.16
14. XII	72	0.5	116 (—)	123	146 (—)	150	175 (—)	150 (Spur)	(—)	0.17
15. XII	72	„	103 (—)	105	126 (—)	156	167 (—)	154 (Spur)	(—)	0.16
17. XII	54		113 (—)	135	143 (—)	160	158 (Spur)	121 (Spur)	(—)	0.16

Um den Einfluss des Ergotamins auf die Zuckerausscheidungs-
schwelle des Diabetikers leicht ersehen zu lassen, habe ich meine
Untersuchungsergebnisse in Tabelle IX zusammengestellt.

TABELLE IX.

Fall	Zuckerausscheidungsschwelle beim		Erniedrigung der Schwelle durch Ergotamin
	Kontrollversuch %	Ergotaminversuch %	
1	0.13	0.12	0.01
2	0.15	0.15	0.00
3	0.19	0.17	0.02
4	0.12—0.13	0.12—0.13	0.00
5	0.16—0.17	0.15	0.01—0.02
6	0.16—0.17	0.16	0.00—0.01
7	0.17	0.15	0.02
8	0.16—0.17	0.16—0.17	0.00

Wie die Tabelle zeigt, hat das Ergotamin bei meinen Untersuchungen den Schwellenwert gar nicht beeinflusst oder auf ihn leicht erniedrigend eingewirkt. Hier sei betont, dass die Schwelle in keinem einzigen Fall durch Ergotamin erhöht wurde.

VERSUCH AM KOHLEHYDRATARM GENÄHRTEN HUNDE.

Wie oben erwähnt, wirkt das Ergotamin auf den Schwellenwert des Diabetikers häufig herabsetzend. Aber die Erniedrigung der Schwelle ist sehr gering und oft wird sie sogar ganz vermisst. Weil es mir nicht ausgeschlossen schien, dass das Gift seine Wirkung ausgeprägter entfalten würde, wenn die Untersuchung bei abnorm erhöhtem Schwellenwert ausgeführt wird, so habe ich den Versuch am kohlehydratarm genährten Hunde wiederholt. Dass die Zuckerassimillationskraft des Hundes durch die einige Tage lang fortgesetzte Eiweiss-Fett-Kost deutlich herabgesetzt wird, wurde in unserer Klinik von Kageura (1922, 1923) festgestellt. Und dabei fand Nakayama (1924), dass der Schwellenwert auch zugleich ansteigt. Nun ging ich bei meinen Untersuchungen so vor, dass ich dem Versuchstiere so viel 30% ige Traubenzuckerlösung durch den Gummischlauch in den Magen einführte, dass dadurch eine leichte Glykosurie hervorgerufen wurde. Der

Blutzuckergehalt wurde anfänglich halbstündlich, dann stündlich 3 bis 4 Stunden lang bestimmt, während der Harn dabei stündlich auf Zucker untersucht wurde. Nachdem der normale Wert der Zuckerausscheidungsschwelle des Hundes auf diese Weise ermittelt war, habe ich vorerst dem Tiere zwei Tage lang Eiweiss-Fett-Kost gegeben und dann an den folgenden Tagen mit oder ohne Ergotaminzufuhr wiederholt den Schwellenwert bestimmt, während das Tier bis zum Ende des Versuches ausschliesslich mit fettreichem Rindfleisch gefüttert wurde. Beim Ergotaminversuche wurde 0.25 mg Gift $\frac{1}{4}$ Stunde vor der Zuckerezufuhr subkutan injiziert. Nicht selten kam es vor, dass diese Giftdose schon als Nebenerscheinung Erbrechen veranlasste, was selbstverständlich das Untersuchungsergebnis trübte. In solchem Fall wurde die Untersuchung unterbrochen. Weil bekanntlich die Empfindlichkeit der Tiere gegen Ergotamin individuell sehr verschieden ist, so habe ich die zu empfindlichen Tiere aus meinem Untersuchungsmaterial weggelassen.

Versuch 1. Hund-Nr. 1. Körpergewicht 9.5 Kg.

Wie die Tabelle X zeigt, war der normale Schwellenwert des Hundes 0.13%. Er stieg bei Eiweiss-Fett-Kost unter deutlicher Verschlimmerung der Zuckerassimilation bis auf ca. 0.18–0.19%, während er bei Ergotaminversuch als 0.17% geschätzt werden musste. Dieser Versuch, bei welchem in der Eiweiss-Fett-Kostperiode zur Bestimmung des Schwellenwertes täglich etwa 30 g Traubenzucker gegeben wurde, beweist, dass die tägliche Zufuhr dieser Menge Zucker den Einfluss der Eiweissfettkost auf den Schwellenwert wie auf die Zuckerassimilation nicht beseitigt. Dieselbe Erscheinung wurde in allen folgenden Versuchen beobachtet.

Versuch 2. Hund-Nr. 2. 11.0 kg.

Bei diesem Hunde war der normale Schwellenwert 0.12%. Am dritten Eiweiss-Fett-Tage stieg er auf 0.16% und am fünften ungefähr auf 0.19%, während er bei Ergotaminversuchen 0.13 resp. 0.12% betrug. Weil die Zuckerezufuhr immer ganz gleich gehalten wurde, so ging, wie man aus der Tabelle XI ersehen kann, die Störung der Assimilationskraft für Zucker vollständig parallel mit der Steigerung der Schwelle.

Versuch 3. Hund-Nr. 3. 11.5 kg.

TABELLE X.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
4. VI	30		85 (—)	116	128 (Spur)	110	92 (Spur)	70 (—)	} 0.13	
8. VI	„		71 (—)	140	130 (Spur)	64	63 (0.37)	63 (—)		
11. VI	„		75 (—)	123	83 (—)	82	80 (Spur)	70 (—)		
vom 11. VI. an Eiweiss-Fett-KKost gegeben										
13. VI	30		68 (—)	169	186 (Spur)	114	73 (Spur)	67 (—)	0.18.	
14. VI	33	0.25	75 (—)	111	147 (—)	150	122 (—)	63 (—)	über 0.15	
15. VI	30		78 (—)	112	187 (Spur)	205	168 (0.34)	100 (Spur)	70 (—)	ein wenig unter 0.20 (ca. 0.19?)
16. VI	45	0.25	77 (—)	123	163 (—)	170	121 (Spur)	90 (Spur)	(—)	0.17

TABELLE XI.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
5. VI	30		66 (—)	107	121 (Spur)	114	104 (Spur)	71 (Spur)	68 (—)	0.12
8. VI	„		69 (—)	118	131 (Spur)	120	85 (0.35)	76 (Spur)	70 (—)	
vom 11. VI. an Eiweiss-Fett-KKost gegeben										
13. VI	30		72 (—)	118	163 (—)	120	68 (Spur)	65 (—)		0.16
14. VI	„	0.25	71 (—)	102	130 (Spur)	111	100 (Spur)	80 (—)		0.13
15. VI	„		76 (—)	192	204 (0.35)	116	107 (0.37)	80 (Spur)		unter 0.20 (ca. 0.19)
16. VI	„	0.25	69 (—)	119	90 (Spur)	104	97 (Spur)	72 (—)		0.12

Wie die Tabelle XII zeigt, betrug der normale Schwellenwert bei diesem Tiere 0.13% und er stieg bei kohlehydratarmer Kost deutlich an, sodass er am dritten Eiweiss-Fett-Tage 0.16% betrug. Die Tatsache, dass die Zuckeraussimili-

TABELLE XII.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
5. VI	30		68 (—)	101	128 (Spur)	95	70 (Spur)	70 (—)	0.13	
8. VI	„		79 (—)	121	134 (Spur)	101	80 (Spur)	71 (Spur)		(—)
vom 16. VI. an Eiweiss-Fett-Kost gegeben										
18. VI	30		75 (—)	127	167 (—)	156	112 (Spur)	88 (Spur)	(—)	0.16
19. VI	42	0.25	78 (—)	84	113 (—)	158	152 (Spur)	123 (0.34)		unter 0.158 (ca. 0.14 oder 0.15)
20. VI	30		80 (—)	173	192 (0.50)	167	96 (0.32)	72 (Spur)		unter 0.19 (ca. 0.17 oder 0.18)
21. VI	42	0.25	77 (—)	87	153 (Spur)	186	151 (0.54)	100 (0.33)		ein wenig unter 0.18 (0.16 oder 0.17)

tionskraft am fünften Eiweiss-Fett-Tage stärker geschädigt war, als an dem dritten und dass auch beim zweiten Ergotaminversuch die alimentäre Hyperglykämie unter gleichen Bedingungen stärker ausfiel als beim ersten, lässt auf die Tendenz schliessen, dass die Störung der Assimilationskraft für Zucker während der Eiweiss-Fett-Perioden trotz kleiner Kohlehydratzufuhr im Laufe der Tage sich allmählich verstärkt. Da bei Versuchen an anderen Hunden die Erhöhung des Schwellenwertes immer mit der Störung der Assimilationskraft für Zucker parallel ging, so ist es wohl möglich, dass diese beiden Faktoren auch in diesem Fall sich in gleicher Weise verhalten. Darauf deutet auch, dass der Schwellenwert beim Kontrollversuche am 18. Juni 0.16% und am 20. ein wenig unter 0.19% (ca. 0.17 oder 0.18%) betrug, während er ebenfalls beim Ergotaminversuch bei der ersten Untersuchung am 19. Juni als ein wenig unter 0.158% (ca. 0.14 oder 0.15%) und bei der zweiten am 21. als ein wenig unter 0.18% (ca. 0.16 oder 0.17%) geschätzt wurde. Bei Versuchen in der Eiweiss-Fett-Periode, ausgenommen den dritten Tag, kam die Glykosurie etwas stärker zustande, sodass man daraus nicht ohne weiteres die Schwelle sicher ermitteln konnte. Daher habe ich je nach der Stärke der Glykosurie einen annähernden Wert der Schwelle schätzungsweise vermerkt, welcher in Klammern angegeben ist. Wenn man dessen eingedenk ist, dass die Schwelle im Laufe der Versuchsperiode etwas ansteigt, so wird man nicht verkennen, dass das Ergotamin auch

in diesem Falle auf den Schwellenwert in gewissem Masse herabsetzend eingewirkt hat.

Versuch 4. Hund-Nr. 4. 11 kg.

Bei diesem Hunde war der Schwellenwert im normalen Zustande 0.12% und bei Eiweiss-Fett-Kost ca. 0.17%, während er bei Ergotaminversuchen ca. 0.15% betrug. (siehe Tabelle XIII).

TABELLE XIII.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	4	
17. VI	30		67 (—)	135	120 (0.32)	98	73 (Spur)	70 (—)	0.12	
19. VI	27		70 (—)	118	100 (—)	92	83 (Spur)	73 (—)		
vom 20. VI. an Eiweiss-Fett-Kost gegeben										
22. VI	30		82 (—)	165	132 (—)	112	71 (—)	70 (—)	über 0.165	
23. VI	45	0.25	77 (—)	102	152 (—)	132	96 (Spur)	86 (Spur)	0.15	
24. VI	30		70 (—)	178	152 (0.33)	113	96 (Spur)	76 (—)	ca. 0.17	
25. VI	45	0.25	85 (—)	98	143 (—)	162	112 (Spur)	90 (0.36)	unter 0.16 (ca. 0.15)	

Versuch 5. Hund-Nr. 5. 11.3 kg.

Da bei diesem Tiere die Glykosurie bei allen Versuchen nicht in Spuren, sondern etwas stärker gefunden wurde, so habe ich aus der Intensität der Glykosurie den Schwellenwert geschätzt, welcher in Klammern angegeben ist. Er ist im normalen Zustande 0.12% und bei Eiweiss-Fett-Kost 0.17–0.19%, während er bei Ergotaminversuchen 0.15–0.17% beträgt. Auch hier verschlimmerte sich die Zuckerassimilation im Laufe der Eiweiss-Fett-Periode, wobei der Schwellenwert die Neigung zeigte demzufolge auch etwas anzusteigen. (siehe Tabelle XIV).

Versuch 6. Hund-Nr. 6. 9.8 kg.

Bei diesem Versuchstiere hat Eiweiss-Fett-Kost auf die Zuckerassimilation wie auf den Schwellenwert keinen merkbaren Einfluss ausgeübt, so dass

TABELLE XIV.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)						Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	½ Std.	1	1½	2	3	
16. VI	30		82 (—)	142	120 (0.41)	92	70 (0.32)	70 (Spur)	unter 0.14 (ca. 0.12)
18. VI	„		73 (—)	130	110 (0.35)	101	92 (Spur)	76 (—)	unter 0.13
von 20. VI an Eiweiss-Fett-Kost gegeben									
22. VI	30		83 (—)	172	186 (0.35)	152	110 (0.35)	96 (Spur)	unter 0.18 (ca. 0.17)
23. VI	45	0.25	70 (—)	112	158 (—)	163	121 (0.37)	90 (Spur)	unter 0.16 (ca. 0.15)
24. VI	30		90 (—)	202	213 (0.37)	182	113 (0.53)	100 (0.32)	unter 0.21 (ca. 0.19?)
25. VI	45	0.25	82 (—)	121	189 (0.42)	178	115 (0.50)	86 (Spur)	unter 0.18 (ca. 0.17?)

er stets 0.12–0.13% betrug. Ebenso wenig hat das Ergotamin auf die Schwelle herabsetzend eingewirkt, sodass sie auch hier denselben Wert (0.12%) zeigte. Da bei Ergotaminversuchen mehr Zucker gegeben wurde, und die alimentäre Hyperglykämie dennoch in gleicher Stärke ausfiel wie bei den Kontrollversuchen, so muss man annehmen, dass die Toleranz des Tieres für Kohlehydrat trotz gleichbleibenden Schwellenwert durch das Gift etwas erhöht wurde (Siehe Tabelle XV).

In Tabelle XVI habe ich meine Untersuchungsergebnisse an den Versuchstieren übersichtlich zusammengestellt.

Bei meinen Untersuchungen konnte ich die Feststellung von Kageura und Nakayama bestätigen, dass beim Hunde nach der einige Tage lang fortgesetzten Eiweiss-Fett-Kost die Zuckerassimilationskraft stark geschädigt wird, und dabei die Zuckerausscheidungsschwelle auch deutlich ansteigt. Ergotamin hat auf die alimentäre Hyperglykämie wie auf den Schwellenwert herabsetzend eingewirkt, ohne dass die beiden, ausgenommen Versuch-Nr. 2, auf den normalen Wert zurückgeführt werden. Bei solchem Befunde könnte man wohl annehmen, dass man durch genügende Vergrößerung der Ergotamindosen den Schwellenwert und die alimentäre

TABELLE XV.

Datum 1928	Zucker- Zufuhr g	Ergo- tamin mg	Blutzucker mg% (Harnzucker)							Zucker- ausschei- dungs- schwelle %
			vor	Std. ½	1	1½	2	3	4	
5. VI	30		90 (—)	101	110 (—)	87	70 (—)	70 (—)	} 0.12	
6. VI	36		82 (—)	135	130 (Spur)	112	81 (0.34)	72 (Spur)		
9. VI	33		77 (—)	117	102 (—)	99	82 (Spur)	68 (—)		
vom 16. VI. an Eiweiss-Fett-Kost gegeben										
18. VI	30		80 (—)	146	140 (0.35)	127	115 (Spur)	93 (Spur)	unter 0.14 (ca. 0.13)	
19. VI	45	0.25	77 (—)	127	95 (Spur)	100	102 (0.33)	92 (Spur)	(—) 0.12	
20. VI	30		72 (—)	101	133 (Spur)	100	90 (0.32)	80 (Spur)	unter 0.13 (ca. 0.12)	
21. VI	45	0.25	80 (—)	112	121 (—)	87	101 (Spur)	90 (—)	0.12	

TABELLE XVI.

Versuchs- Nr.	Normal	Zuckerausscheidungsschwelle %		
		bei Eiweiss-Fett-Kost	bei Ergotaminversuch	Erniedrigung durch Ergotamin
1	0.13	0.19	0.17	0.02
2	0.12	a) 0.16	0.13	0.03
		b) 0.19	0.12	0.07
3	0.13	a) 0.16	0.14 oder 0.15	0.02—0.01
		b) 0.19	0.16 oder 0.17	0.03—0.02
4	0.12	0.17	0.15	0.02
5	0.12	a) 0.17	0.15	0.02
		b) 0.19	0.17	0.02
6	0.12	a) 0.13	0.12	0.01
		b) 0.12	0.12	0.00

Hyperglykämie noch stärker herabsetzen kann. In der Praxis jedoch scheitert gewöhnlich ein solcher Versuch, weil bei grösserer

Giftzufuhr sehr häufig Nebenerscheinungen, wie Erbrechen u.a., vorkommen.

Während bei Versuchen an Zuckerkranken die Herabsetzung des Schwellenwertes durch Ergotamin häufig ganz vermisst wurde, wurde eine solche hier in allen den Fällen beobachtet, in welchen die Schwelle durch Eiweiss-Fett-Kost deutlich angestiegen war. Eine einzige Ausnahme stellt der Versuch Nr. 6 dar, bei welchem der Schwellenwert durch kohlehydratarme Kost gar nicht erhöht und ebensowenig durch Ergotamin beeinflusst wurde. Mein Untersuchungsergebnis an Zuckerkranken wie an kohlehydratarm genährten Hunden macht es höchst wahrscheinlich, dass das Ergotamin auf den abnorm gesteigerten Schwellenwert stärker herabsetzend wirkt, als auf den normalen. Damit stimmt der Befund von Kawashima und Iwanaga (1928) überein, dass das Ergotamin den subnormalen Schwellenwert des vagotomierten Hundes gar nicht herabsetzt.

Hier sei erwähnt, dass ich bei meinen Untersuchungen, besonders an Zuckerkranken, beobachtete, dass Ergotamin oft nur auf die alimentäre Hyperglykämie, aber nicht auf den Schwellenwert herabsetzend eingewirkt hat. Bei Versuchen an Tieren mit einem abnorm gesteigerten Schwellenwert indes ging die Erniedrigung der Schwelle mit der alimentären Hyperglykämie ungefähr parallel. Da Ergotamin auf die Magenentleerung verzögernd und auf die Darmschleimhaut anämisierend wirkt (Pollak 1927), so muss man annehmen, dass die Unterdrückung der alimentären Hyperglykämie durch Ergotamin teils auf der Ausschaltung der sympathischen Erregung und teils auf der Verzögerung der Zuckerresorption beruht. Bei solcher Sachlage ist die Unterdrückung der alimentären Blutzuckersteigerung durch das Gift kein direkter Beweis dafür, dass der Sympathicotonus dementsprechend herabgesetzt ist. Ausserdem ist es auch von vornherein denkbar, dass die sympathicuslähmende Wirkung des Ergotamins bei gesteigerter Sympathicotonie deutlicher in die Erscheinung tritt als bei der normalen oder subnormalen. Daraus, dass bei den Versuchen an

kohlehydratarm genährten Hunden die Erniedrigung des Schwellenwertes mit der alimentären Hyperglykämie durch Ergotamin im grossen und ganzen parallel ging, und nur bei einem Hunde (Nr. 5.) mit einem normalen Schwellenwert eine isolierte Unterdrückung der alimentären Blutzuckersteigerung beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass die durch Ergotamin hervorgerufene Herabsetzung der alimentären Hyperglykämie bei unbeeinflusstem Schwellenwert nicht auf dem Nachlassen des Sympathicotonus, sondern vielleicht auf der Verzögerung der Zuckerresorption beruht.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG.

1. 0.3–0.5 mg Ergotamin beeinflussen den Schwellenwert des leichten oder mittelschweren Diabetikers gar nicht oder wirken darauf leicht erniedrigend. In keinem einzigen Fall wurde eine Erhöhung des Schwellenwertes beobachtet.

2. Die Angabe von Kageura, dass einige Tage lang fortgesetzte Eiweiss-Fett-Kost die Zuckerassimilationskraft des Hundes in der Regel deutlich herabsetzt und diejenige von Nakayama, dass der Schwellenwert unter diesen Umständen deutlich ansteigt, wurde von mir bestätigt.

3. Bei Hunden, deren Schwellenwert durch Eiweiss-Fett-Kost deutlich erhöht war, wirkten 0.25 mg Ergotamin ohne Ausnahme schwellenerniedrigend. In einem Falle jedoch, bei welchem der Schwellenwert durch kohlehydratarme Kost gar nicht erhöht war, blieb er auch nach der Ergotaminzufuhr unverändert.

4. Ergotamin scheint auf den abnorm gesteigerten Schwellenwert stärker herabsetzend zu wirken, als auf den normalen.

5. Die Unterdrückung der alimentären Hyperglykämie durch Ergotamin wurde auch in Fällen beobachtet, wo der Schwellenwert gar nicht beeinflusst wurde. Diese Dissoziation beruht wohl darauf, dass die Erniedrigung des Schwellenwertes wesentlich durch die Herabsetzung des Sympathicotonus, die durch Ergotamin hervorgerufene Erhöhung der Toleranz für Kohlehydrat dagegen

teils durch die Ausschaltung der sympathischen Erregung und teils durch die Verzögerung der Zuckerresorption zustande kommt. Wenn der Sympathicotonus bei Ergotaminversuchen unverändert bleibt, so soll meines Erachtens nur die alimentäre Hyperglykämie, aber nicht der Schwellenwert unterdrückt werden.

LITERATUR.

- Eda, G. (1927): I. Über den Einfluss des Insulins auf die Zuckerausscheidungsschwelle und seine Nachwirkung auf die Zuckerassimilation. II. Einfluss der partiellen Pankreasexstirpation auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **7**, 1, 53.
- Eda, G. (1927): I. Über den Einfluss des Acetylcholinchlorids und des Pilocarpins auf die Zuckerausscheidungsschwelle. II. Einfluss des Atropins und Scopolamins auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **7**, 2, 319.
- Eda, G. (1928): Einfluss des Ergotamins auf experimentelle Hyperglykämieen. *Journ. of Biochem.*, **9**, 1, 285.
- Eda, G. (1928): Über den Einfluss des Ergotamins auf den Blutzucker-gehalt. *Journ. of Biochem.*, **9**,
- Grunke, W. (1926): Über den Mechanismus der alimentären Hyperglykämie. 1. Mitt. Der Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die alimentäre Hyperglykämie. *Zeits. f. d. ges. exp. Med.*, **52**, 488.
- Ho Sup Shim (1925): Einfluss des Atropins und des Pilocarpins auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **5**, 333.
- Hetenyi, S. und Pogany, J. (1927): Ergotaminversuche zur Frage des Kohlehydratstoffwechsels. *Verhandl. d. Kong. f. inn. Med.*, **38**, 306.
- Kawashima, S. (1927): I. Über den Einfluss des Schilddrüsenpräparates auf die Zuckerausscheidungsschwelle. II. Über den Einfluss der Ovariectomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle. III. Über den Einfluss der Kastration des Hodens auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **7**, 2, 361.
- Kawashima, S. (1928): Über den Einfluss der Sympathicotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **9**,
- Kawashima, S. und Iwanaga, Y. (1928): Über den Einfluss der Vago-Splanchnicotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle. *Journ. of Biochem.*, **10**, 97.
- Kageura, N. (1922): Über den Einfluss der Eiweiss-Fett-Kost auf den Kohlehydratstoffwechsel. I. Mitt. *Journ. of Biochem.*, **1**, 3, 333. II. Mitt. **1**, 3, 389.

- Kageura, N. (1923): Über den Einfluss der Eiweiss-Fett-Diät auf den Kohlehydratstoffwechsel. III. Mitt. Journ. of Biochem., **2**, 2, 341.
- Nakayama, M. (1924): Der Einfluss von kohlehydratarmer Kost und von Adrenalininjektion auf die Zuckerausscheidungsschwelle. Journ. of Biochem., **1**, 1, 139.
- Pollak, L. (1927): Über den Mechanismus der alimentären Hyperglykämie. Kl. Wochens., **41**, 1942.

THE EFFECT OF THE ADDITION OF PROTEINS ON THE SURFACE TENSION OF THE SOLUTION CON- TAINING SURFACE ACTIVE ACID OR BASE.

By

RYUZO SUGINO.

(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.

Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)

(Received for publication, May 5, 1929.)

In the previous communication (Sugino, 1928), it was pointed out that the addition of protein to the glycocholate solution gives rise to a change in the surface tension of the latter. This effect is observed only when protein is present as cation in the solution. If the dissociation of protein as cation is suppressed by the increase of pH values, the surface tension of the solution shows the value which equals the result of the addition of surface tension of two component solutions. It was also shown that the less active surface tension of weak glycocholate solution, (1/1000 mol), became quite active on the addition of certain amount of protein, whereas, on the other hand, very active surface tension of a more strong solution, (1/100 mol), became less active on the presence of protein. The significant result obtained here is that in both cases the same value of surface tension is obtained, indicating that value as representing the surface tension of protein glycocholate solution.

In the following paragraphs, the effect of addition of proteins into the amylamine solution at various pH values on the surface activity is discussed. The amylamine is used as it represents quite a surface active substance and is easily soluble in water. The proteins added were protamine-sulphate and caseinogen.

I. THE SURFACE TENSION OF AMYLAMINE SOLUTION.

The calculated amount of isoamylamine (Kohlbaum) was dissolved into a definite quantity of water to make a solution

of one mol. concentration. The was used as a stock solution and from this three solutions of 1/1000, 1/100 and 1/10 mol. solution at various pH value were prepared. Each solution of definite pH value was obtained by the addition of various amounts of either hydrochloric acid or sodium hydroxide. The surface tension of each of these solutions was determined at 25°C by the use of a stalagmometer. The procedure remained the same as described in the previous report. The result is shown in table I and figure 1.

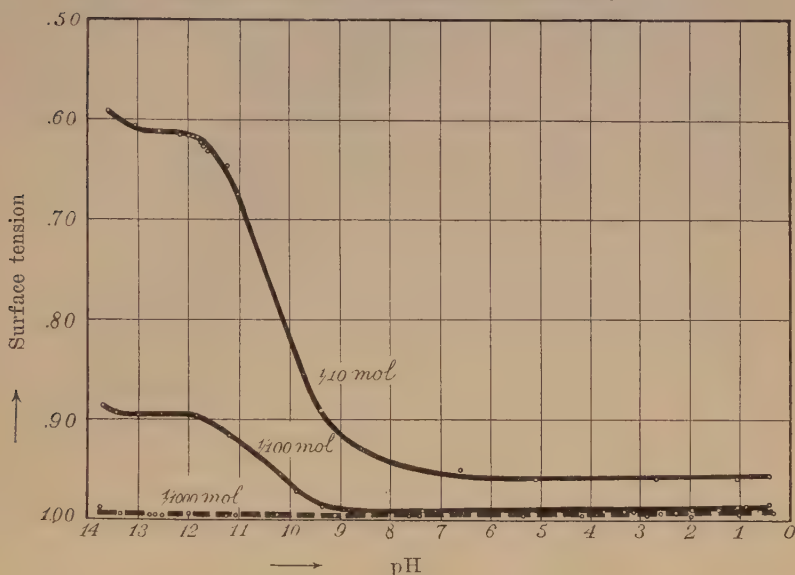
TABLE I.

Surface tension of amylamine solution of different concentration at various pH values.

1/10 mol amylamine solution		1/100 mol amylamine solution		1/1000 mol amylamine solution	
pH	Surface tension	pH	Surface tension	pH	Surface tension
0.45	0.953	0.51	0.985	0.32	0.994
1.07	0.960	0.87	0.987	1.01	0.994
2.62	0.958	1.06	0.987	2.05	0.994
5.10	0.955	1.41	0.990	2.90	0.994
6.59	0.950	1.97	0.990	4.16	0.994
9.35	0.892	2.29	0.993	5.29	0.994
11.02	0.675	2.58	0.992	7.86	0.994
11.23	0.647	3.15	0.991	7.62	0.994
11.60	0.631	3.32	0.991	9.05	0.994
11.71	0.628	3.70	0.990	10.21	0.995
11.78	0.626	4.38	0.990	11.03	0.994
11.82	0.624	7.30	0.990	11.22	0.994
11.90	0.623	9.29	0.985	12.00	0.994
11.99	0.619	9.88	0.972	12.50	0.994
12.20	0.618	11.22	0.915	12.61	0.994
12.62	0.616	11.80	0.893	12.69	0.994
13.04	0.608	12.53	0.894	13.31	0.994
13.59	0.593	13.01	0.896	13.70	0.994
		13.40	0.892		
		13.72	0.887		

Fig. 1.

Surface activity of amylamine at various pH.



As can be seen from the table and figure the surface tension of 1/1000 normal amylamine solution is almost inactive and does not change at varying pH values. At a higher concentration the surface activity increases with the concentration, especially when the pH value does not allow the existence of aminechloride over a certain limited amount. At pH 11.8 the surface activity seems to attain its maximum value in respective solutions.

II. THE SURFACE TENSION OF A SOLUTION CONTAINING BOTH AMYLAMINE AND PROTAMINE.

As already reported in a previous communication, the protamine solution remains inactive at the concentration of 0.4 percent. In this experiment, protamine was added in various concentrations into 1/1000, 1/100, and 1/75 amylamine solution at pH 13.3. The result is shown in table II and fig. 2.

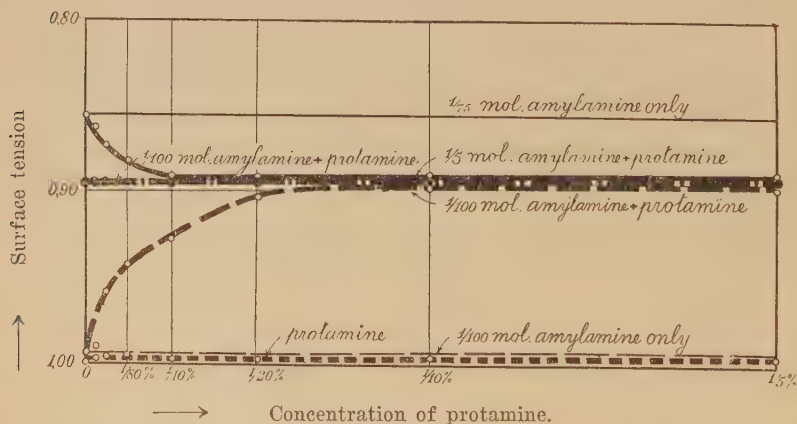
TABLE II.

Surface tension of a solution containing 1/75 mol., 1/100 mol. and 1/1000 mol. amylamine and various amount of protamine at pH 13.3

End concentration of protamine (%)	Surface tension of the solution			
	1/75 mol. amylamine + protamine	1/100 mol. amylamine + protamine	1/1000 mol. amylamine + protamine	Protamine only
0	0.856	0.896	0.993	1.000
1/320	0.862	0.895	0.990	0.997
1/160	0.873	0.895	0.958	0.995
1/ 80	0.882	0.895	0.942	0.995
1/ 40	0.896	0.894	0.927	0.997
1/ 20	0.896	0.895	0.902	0.997
1/ 10	0.896	0.895	0.896	0.995
1/ 5	0.895	0.895	0.896	0.995

Fig. 2.

Surface activity of the solution containing amylamine (1/75 mol., 1/100 mol., 1/1000 mol.) and protamine at pH 13.3.



From the table and figure we can observe two following facts.

1. 1/1000 mol. amylamine solution at pH 13.3 is almost surface inactive and becomes active upon the addition of protamine,

which itself is inactive. The surface activity increases with the concentration of protamine until the latter amounts to 0.1%, thereafter the further addition of protamine remaining without any effect; the maximum value is 0.895.

2. 1/100 mol. amylamine, the surface activity of which coincides almost with that of above mentioned final value in the protamine + 1/1000 mol amylamine solution, experiences no change in its surface tension on the addition of protamine in increasing amount.

3. 1/75 mol. amylamine, the surface tension of which is much more active than the above mentioned value, shows a decrease in its surface activity on the addition of protamine and reaches the value 0.896 at 0.25% protamine content.

Further increase in protamine evokes no decrease in surface activity. These facts tell us very clearly that the surface tension of a solution containing amylamine and protamine is caused by the surface orientation of the compound protamine-amylamine. At pH 13.3 where protamine exists as an anion, amylamine can combine with protamine and produce a compound with a certain definite

TABLE III.

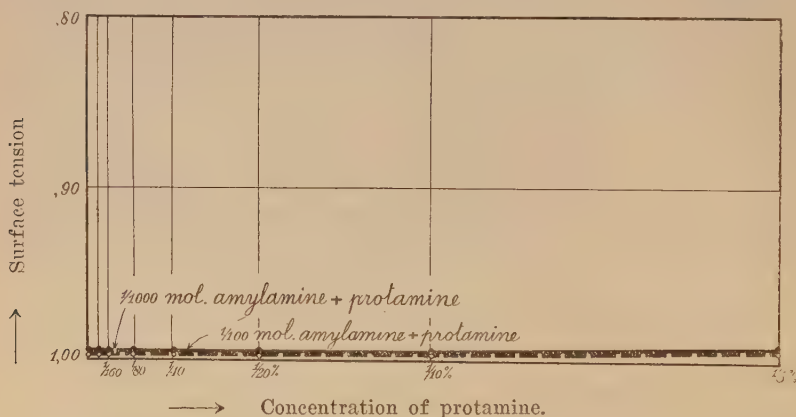
Surface tension of a solution containing various amounts of protamine and 1/100 mol. and 1/1000 mol. amylamine at pH=5.

End concentration of protamine (%)	Surface tension of the solution		
	1/100 mol. amylamine + protamine	1/1000 mol. amylamine + protamine	Protamine only
0	0.990	0.994	1.000
1/320	0.992	0.995	0.995
1/160	0.992	0.996	0.995
1/ 80	0.994	0.996	0.995
1/ 40	0.994	0.996	0.995
1/ 20	0.994	0.996	0.995
1/ 10	0.994	0.996	0.995
1/ 5	0.994	0.996	0.995

surface activity. That this supposition is probable can be shown from the following experiment. When amylamine and protamine were mixed at pH 5, where protamine exists only as a cation and can not combine with amylamine, no change in surface activity is observed. The solution containing 1/100 mol amylamine and protamine of various concentration at pH 5, remains entirely inactive. This can be seen from table III and figure 3.

Fig. 3.

Surface activity of the solution containing amylamine and protamine at pH 5.



III. THE SURFACE ACTIVITY OF A SOLUTION CONTAINING 1/1000 mol. AMYLAMINE AND 0.2% PROTAMINE AT VARIOUS H-ION CONCENTRATIONS.

In the previous chapter, it is shown that in the solution, where protamine can exist as an anion, amylamine and protamine enter into a chemical combination and produce a definite compound, which has a specific surface activity, while in the more acidic solution, where protamine exists almost entirely as cation, the substances do not form any definite chemical compound and the solution remains surface inactive.

From this it follows that when the pH value of a solution con-

taining a protamine amylamine compound is less than a certain value the compound is completely dissociated, while when the pH of the solution is larger than a certain value, the combination occurs, which will become complete at a certain acidity. In the inter-

TABLE IV.

Surface tension of 0.2% protamine and 1/1000 mol. amylamine at various pH values.

0.2% protamine + 1/1000 mol. amylamine		1/1000 mol. amylamine alone	
pH	Surface tension	pH	Surface tension
1.75	0.994	0.32	0.994
2.65	0.994	1.01	0.994
3.97	0.995	2.05	0.994
4.75	0.995	2.90	0.994
5.61	0.994	4.16	0.994
5.96	0.993	5.29	0.994
7.90	0.995	7.36	0.994
8.32	0.995	7.62	0.994
8.58	0.995	9.05	0.994
9.02	0.994	10.21	0.995
9.15	0.995	11.03	0.994
9.32	0.995	11.22	0.994
9.50	0.994	12.00	0.994
9.99	0.987	12.50	0.994
10.31	0.972	12.61	0.994
11.29	0.944	12.69	0.994
11.40	0.938	13.31	0.994
11.56	0.929	13.70	0.993
12.23	0.908		
12.54	0.893		
12.65	0.895		
13.01	0.894		
13.35	0.894		
13.60	0.892		

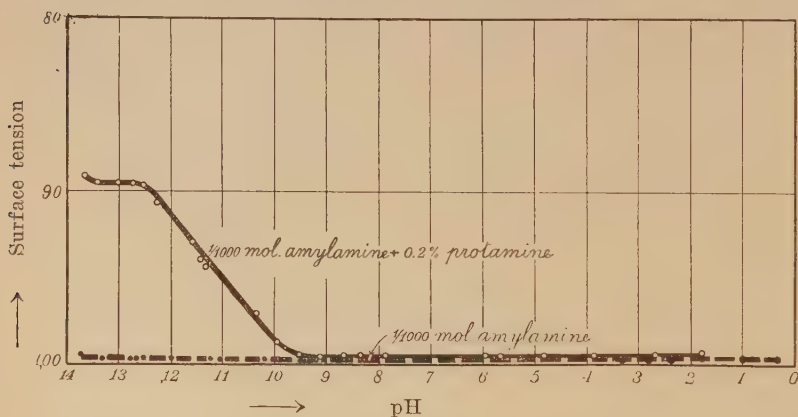
mediate position of acidity the quantity of amylamine and protamine entering into chemical combination varies, depending on the variation of the pH with a consequent variation in the surface activity.

To follow the relation of this interdependence between the pH value of the solution and the combination grade of protamine amylamine compound, I have determined the surface tension of the solution containing 1/1000 mol. amylamine and 0.2% protamine at various pH values. The divergent value of the pH of the solution was made by the addition of various amounts of HCl and NaOH to the solution, and was measured either by quinhydrone electrode or by gas electrode.

The results are shown in table IV and figure 4.

Fig. 4.

Surface activity of the solution containing 0.2% protamine and 1/1000 mol. amylamine at various pH.



As can be seen from this curve the surface tension of the mixture does not differ from that of emylamine solution at the lower value of pH than $\text{pH} = 9.5$, indicating that there exists no combination between amylamine and protamine in these regions, while on the other hand the difference of surface tension between the mixture

TABLE V.

Surface activity of 0.2% protamine and 1/1000 mol. amylamine
at various pH values.

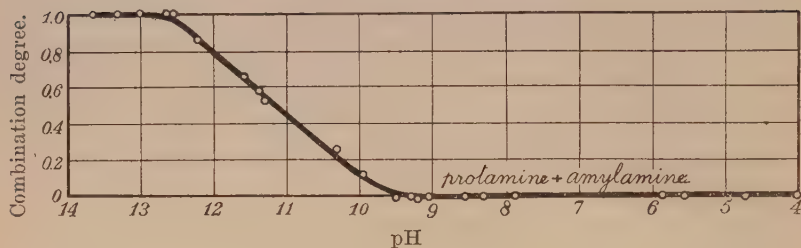
pH	$\Delta\sigma_m$	$\Delta\sigma$	<u>Activity of mixture</u> Activity of amylamine	Degree of combination
1.75	0.006	0.006	1.00	0
2.65	0.006	0.006	1.00	0
3.97	0.005	0.006	0.84	0
4.75	0.005	0.006	0.84	0
5.61	0.006	0.006	1.00	0
5.96	0.007	0.006	1.06	0.01
7.90	0.005	0.006	0.84	0
8.32	0.005	0.006	0.84	0
8.58	0.005	0.006	0.84	0
9.02	0.006	0.006	1.00	0
9.15	0.005	0.006	0.84	0
9.32	0.005	0.006	0.84	0
9.50	0.005	0.006	0.84	0
9.99	0.013	0.006	2.13	0.12
10.31	0.028	0.006	46.70	0.26
11.29	0.056	0.006	93.40	0.53
11.40	0.062	0.006	103.20	0.58
11.56	0.071	0.006	118.20	0.67
12.23	0.092	0.006	153.50	0.87
12.54	0.107	0.006	178	1.00
12.65	0.105	0.006	176	1.00
13.01	0.106	0.006	177	1.00
13.35	0.106	0.006	177	1.00
13.60	0.108	0.006	180	1.01

and amylamine solution, attains its maximum value at pH=12.5, indicating that amylamine and protamine fully combine with each other. At intermediate positions of pH the surface tension gradually varies with the change of pH value, corresponding to the degree of combination of two constituents.

As we have considered in the previous paper (Sugino, 1928)

Fig. 5.

The combination degree of protamine amylamine at various pH.



we can construct the dissociation residual curve of amylamine-protamine compound from the values of surface tension of the mixture and that of amylamine at various pH by the following formula

$$\frac{\Delta\sigma_m}{\Delta\sigma_a}.$$

Here $\Delta\sigma_m$ denotes the lowering of surface tension of the mixture from that of water, and $\Delta\sigma_a$ corresponding value of amylamine (See table V and curve 5).

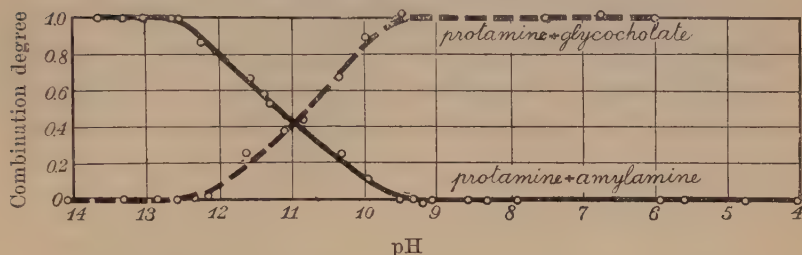
From this curve it may be reasonable to suppose that at pH lower than 9.5 the dissociation of protein as an acid is entirely inhibited, while at pH 12.5 the protein can exist fully as an anion. The curve therefore may be taken as a dissociation curve of protamine as an acid. The pH value corresponding to 0.5 dissociation grade then may represent pK_a of protamine, giving $10^{-11.2}$ for K_a .

IV. THE ISOELECTRICAL POINT OF PROTAMINE.

If we plot the dissociation curve of protamine as an acid obtained in the preceding section together with that as a base obtained in a previous report (Sugino, 1928) we get the curves shown in figure 6. The value of pH corresponding to the intersecting point of these two curves $pH = 11.0$ represents the isoelectric point of protamine.

Fig. 6.

The combination degree of protamine glycocholate and amylamine protamate at various pH.



Suguru Miyake (1927), using the method of electrophoresis, obtained the value of the isoelectric point of protamine. Determination of isoelectric point by means of electrophoresis, however, seems difficult to give a true value, the place of the point differing according to the nature of electrolyte present.

V. THE SURFACE TENSION OF A SOLUTION CONTAINING BOTH AMYLAMINE AND CASEINOGEN.

In the foregoing paragraphs we have seen that the surface tension of the amylamine solution at a larger pH than pH 12.5 tends to get a definite value on the addition of protamine without regard to whether the amylamine had a larger or a lower surface tension, indicating that there exists a definite compound between amylamine and protamine, which has a definite surface activity. It was also shown that at a lower pH value than 9.5, there is no indication of the presence of amylamine-protamine compound.

The same relation is also found when we replace protamine with caseinogen. This is quite obviously shown in the following two experiments performed at pH 13 and pH 3.

A. Experiment at pH 13.

Different from in the case with protamine caseinogen lowers the surface tension of water in its solution, the degree of lowering

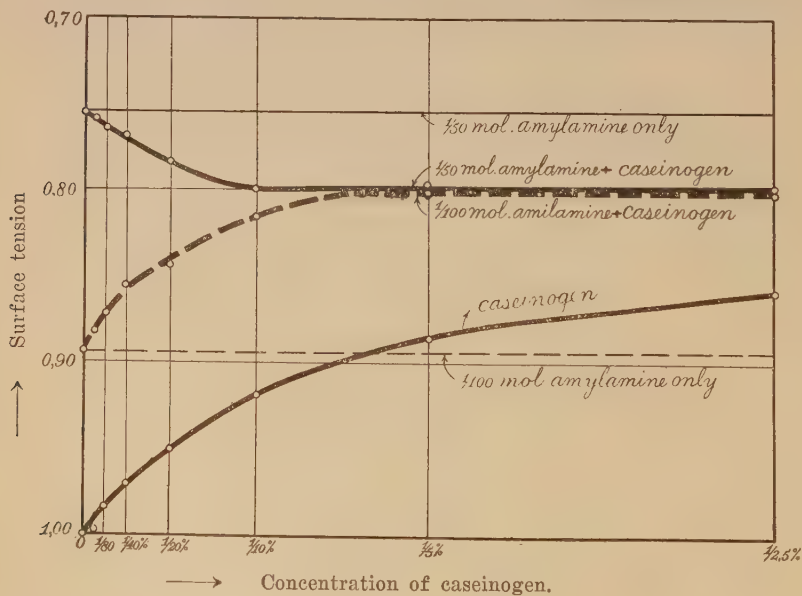
TABLE VI.

Surface tension of solution containing 1/50 mol. and 1/100 mol. amylamine and various amount of caseinogen at pH 13.

End concentration of caseinogen (%)	Surface tension of the solution		
	1/50 mol. amylamine + caseinogen	1/100 mol. amylamine + caseinogen	Caseinogen only
0	0.755	0.894	1.000
1/160	0.759	0.882	0.998
1/ 80	0.764	0.871	0.983
1/ 40	0.768	0.855	0.970
1/ 20	0.783	0.843	0.950
1/ 10	0.800	0.815	0.919
1/ 5	0.798	0.800	0.886
1/ 2.5	0.798	0.802	0.858

Fig. 7.

Surface activity of the solution containing amylamine and caseinogen at pH 13.



naturally increases with the concentration as is shown in a lowest curve of figure 7, and the corresponding values in table VI.

When we add the caseinogen into 1/100 mol. amylamine solution, the surface tension of which lies at 0.894, in an increasing amount the surface tension lowers at first with the increase of caseinogen. The degree of lowering becomes less and less, however, and finally tends to the value of 0.80. On the other hand when we add the caseinogen into 1/50 mol. amylamine, the surface tension of which is 0.755, in an increasing amount the surface tension increases at first with the amount of caseinogen added. The degree of increasing becomes however less and less and finally tends to the value of 0.798. We get the same surface tension by adding caseinogen either to dilute amylamine with higher surface tension or to concentrated amylamine solution with lower surface tension.

This indicates that there exists a certain definite compound of certain surface activity between amylamine and caseinogen.

The result is shown in table VI and figure 7.

TABLE VII.

Surface tension of solution containing 1/50 mol. and 1/100 mol. amylamine and various amount of caseinogen at pH 3.

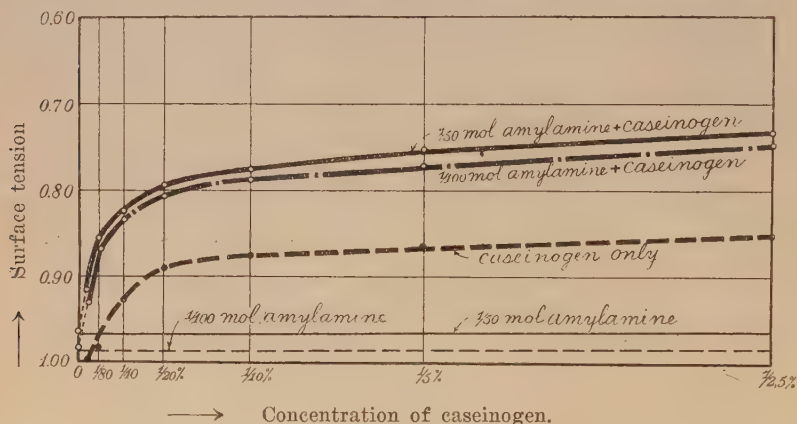
End concentration of caseinogen (%)	Surface tension of the solution		
	1/50 mol. amylamine + caseinogen	1/100 mol. amylamine + caseinogen	Caseinogen only
0	0.964	0.982	1.000
1/160	0.917	0.933	0.992
1/ 80	0.855	0.875	0.981
1/ 40	0.823	0.837	0.925
1/ 20	0.798	0.804	0.890
1/ 10	0.776	0.788	0.878
1/ 5	0.752	0.772	0.862
1/ 2.5	0.734	0.749	0.847

B. Experiment at pH 3.

The surface tension of mixture of amylamine and varying amount of caseinogen was determined in the solution at pH 3. As can be seen in table VII and figure 8, however, there is no indica-

Fig. 8.

Surface activity of the solution containing amylamine and caseinogen at pH 3.



tion for the existence of amylamine-caseinogen compound. The surface activity of the mixture has only to be considered to show the additive character of that of constituent solution. The difference of lowering of surface tension of 1/50 mol. and 1/100 mol. amylamine solution with increasing amount of caseinogen is nearly equal to the difference of pure amylamine at corresponding concentrations.

SUMMARY.

1. The surface tension of an amylamine solution is or is not influenced by the addition of a protein, according to the hydrogen ion concentration of the solution.

2. Only at a H-ion concentration of the solution where a protein exists as anion does the presence of the protein influence the surface activity of the amylamine solution. The change of the

surface activity is caused by the combination of protein with amylamine and tends to get the same definite value, whether we manipulate with either lower or higher concentration of the amine.

3. The isoelectric point of protamine lies at pH 11.0.

I wish to express my indebtedness to Professor S. Kakiuchi for his interest and advice throughout this investigation.

REFERENCES.

Miyake, S. (1927): Zeits. f. physiol. Chem., **172**, 223.

Sugino, R. (1928): J. of Biochem., **9**, 353.

CORRECTION TO THE PREVIOUS REPORT.

In the first report of this series (Sugino: J. of Biochem. **9**, 380) read in 8th line from below:

$10^{-3.2}$ instead of $10^{-8.3}$

SOME INVESTIGATIONS ON THE QUESTION OF THE ORIGIN OF PLASMA PROTEINS.—I.

The action of various tissues on serum proteins.

By

JUDO SENSU.

(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)

(Received for publication, May 20, 1929.)

I. INTRODUCTORY.

Although there have been various hypotheses put forward about the origin of the plasma proteins the conclusive evidence is still lacking. Berger (1922), in studying the change of distribution of the blood proteins by injecting protein in rabbits, reached the conclusion that the increase is to be looked upon as the result of increased release of protein from the cell, and that an increase in globuline in the blood may be the result of an increased formation of the globuline in the cells. Recently, probably anticipating the site of production of the blood protein in muscle, liver and kidney, he studied the proteins contained in them, but so far no positive evidence has been obtained.

Whipple and his co-workers (1918), studying the protein regeneration after plasma depletion or plasmapheresis, found that the reconstruction of plasma proteins was retarded greatly in the case of extreme liver lesion.

As liver and muscle are rich in protein and may serve as the store-house of body proteins as many authors consider, it seems quite reasonable to consider that they may contribute a great deal to the production of plasma proteins. Dr. Komatsu (1927) in our laboratory found that the reduction of the albuminc-

globuline ratio of the plasma proteins in hematoporphyrin rabbits was always accompanied by the change of ratio N:S in liver and muscle tissue, and put forward the hypothesis that liver and muscle might partake in the production of blood protein, the former losing more of its protein rich in sulphur, while the latter is deprived of more of its protein poor in it. But in his paper he left the relation between the nature of the protein which disappeared from the tissues and the nature of the blood proteins undiscussed, and this point needs further study.

It seems to me logical to suppose that the deposition and depletion of protein in or from the tissue cells may be accompanied by a corresponding enzymic action. If, therefore, there are different enzymic actions for albumine and globuline noticeable, the study of the change in such enzymic activities under different conditions, where the amount of albumine and globuline of blood plasma varies in various ratios, may elucidate the relation of protein in tissues, such as liver and muscle, to the blood protein. With such an idea in mind, I examined the proteolytic activity of various organs against blood serum proteins and found, curiously enough, that body tissues, as will be seen below, may be divided into two groups—the one, which digests only the serum albumine and can not act on serum globuline,—and the other, which is able to peptise the blood globuline and is almost inactive against serum albumine. The change in such proteolytic activities of tissue under various conditions will be reported in the next successive communications.

In this report the normal distribution of proteolytic activities in tissues will be discussed.

II. EXPERIMENTAL PROCEDURE.

Full grown, male, albino rabbits weighing 2500–3000 gm. were used throughout the experiments, and their blood vessels were well washed out by injecting physiological saline solution centripetal into Vena jugularis of the animal, the blood being drained off from the peripheral cut end of the vein. When the out-coming

fluid became colourless, their organs (Bone-marrow, kidney, liver, lung, muscle and spleen) were taken out and well ground with sea sand in a mortar and extracted with ten times their weight of physiological saline solution. The organ extracts, thus obtained, were well mixed with nine times their volume of blood serum of the same animal, and the mixtures were divided into a series of small test tubes in an amount of one cc. each, added with toluol and kept in the incubator at 37°C for three weeks. At the end of each week, test tubes necessary for the determination were taken out of the incubator and their albumine and globuline content was estimated by the methods described below. As the control experiment the decomposition of organ extracts under the same condition was examined. As in the main experiment, where the reaction of the mixture remained always at pH 7.4 by the buffering action of the serum present, the reaction in the experiment of organ extract alone was also carefully adjusted to pH 7.4.

Method for the estimation of albumine and globuline.

The amount of the total protein and albumine was estimated experimentally, while the globuline content was obtained by the subtraction of the albumine value from the total protein value.

a) *Total protein*: one cc. of protein solution is diluted to 10 cc. with the addition of 0.8% NaCl solution, and 2 cc. of this diluted solution are pipetted into each conical centrifuge tube, mixed with a definite amount of $n/4$ solution of acetic acid and saturated solution of NaCl, and heated in a steam bath for twenty minutes. The protein coagulant produced is then centrifugalized, washed with boiling water and again centrifugalized. The precipitate is dissolved in one cc. of concentrated H_2SO_4 , transferred to a large digestion test tube made of hard glass and kjeldahlized by Folin's micro-method.

b) *Albumine*: Another one cc. of the solution is diluted to 10 cc. and the globuline fraction is precipitated by the saturation of $MgSO_4$ by Van Slyke's method, and the precipitate is filtered

off. Two cc. of this filtrate are treated by the same procedure as in the case of total protein and the albumine content is thus determined.

III. RESULT.

I. Experiment. Proteolytic action of cell-free organ extracts upon blood protein.

That the organ extracts obtained simply by grinding the organ with sand and extracting with saline solution, though containing much protein, had no proteolytic action, was first discovered by Smith as early as 1894 and was ascertained by Levene and Dernby, who showed in 1918 that the filtered, cell free extracts of liver and spleen had no action upon gelatine and pepton, the decomposition of the protein appearing only after the addition of cell suspension.

Our experiments with various tissue extracts mentioned above also remained inactive when the extracts were filtered many times through filter paper. The result obtained was shown in Table I.

In the control experiment a series of 1.0 cc. of each organ extract was incubated and the protein content at the end of the 1st, 2nd and 3rd week was examined. Some of the organ extracts in these experiments became cloudy and even the precipitation of protein took place. Owing to this event, the separate estimation of albumine and globuline in the control experiment became meaningless after one week, and so it was abandoned, only the change of total proteins being estimated. In this experiment, therefore, it occurred that the albumine from the organ extracts behaved itself as if it were globuline at the separation of protein fractions by $MgSO_4$, and was estimated after one week as globuline in serum and extract mixture, but the apparent increase of globuline from this source was so small that it fell within the limits of experimental error, and so, in prosecuting the change in the amount of albumine and globuline of the serum, this error seemed to be

TABLE I.

The digestive activity of cell free organ extract upon blood proteins.
(Amount of protein nitrogen in term of cc. of N/100 NaOH).

Organ	Digestive mixture	Amount of protein present				
		Nature of Proteins	Beginning	I week	II weeks	III weeks
Bone-marrow	Bone-Marrow 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	cc. 22.8	cc. 22.7	cc. 23.1	cc. 23.0
		Glob.	9.8	9.9	9.7	9.8
	Bone-Marrow alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.2			
		Glob.	0	0.2	0.2	0.2
Spleen	Spleen 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	23.7	24.0	23.6	23.8
		Glob.	11.3	11.0	11.1	11.0
	Spleen alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0			
		Glob.	0.1	0.11	0.11	0.11
Lung	Lung 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	24.8	24.9	24.8	24.8
		Glob.	10.0	10.1	10.3	10.3
	Lung alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.07			
		Glob.	0.13	0.2	0.19	0.19
Liver	Liver 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	28.1	28.8	28.3	28.3
		Glob.	13.4	13.9	13.4	13.5
	Liver alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.18			
		Glob.	0.41	0.56	0.58	0.58
Kidney	Kidney 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	29.0	28.8	28.8	28.5
		Glob.	13.4	13.9	13.4	13.6
	Kidney alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.3			
		Glob.	0.03	0.33	0.34	0.33
Muscle	Muscle 0.1 cc. + Serum 0.99 cc.	Alb.	27.5	27.5	27.3	27.4
		Glob.	19.0	18.7	18.9	18.9
	Muscle alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.09			
		Glob.	0.13	0.23	0.23	0.23
	Serum alone 1 cc.	Alb.	30.7	30.5	30.7	30.5
		Glob.	19.2	19.0	19.3	19.1

TABLE II.

The digestive activity of organ paste upon blood proteins.
(Amount of protein nitrogen in term of N/100 NaOH).

Organ	Digestive mixture	Amount of protein present					
		Nature of Proteins	Beginning	I week	II weeks	III weeks	Decrease
Liver	Liver 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	cc. 18.0	cc. 17.4	cc. 16.3	cc. 14.8	3.2 (18%)
		Glob.	15.0	15.1	14.7	14.8	
	Liver alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.08	0	0	0	
		Glob.	0.57	0.63	0.54	0.54	
Muscle	Muscle 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	22.8	22.6	22.5	22.7	1.6 (10%)
		Glob.	15.6	15.1	14.5	14.0	
	Muscle alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.16	0	0	0	
		Glob.	0.27	0.39	0.39	0.38	
Lung	Lung 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	19.3	19.3	19.3	19.4	none
		Glob.	11.3	11.0	11.0	10.9	
	Lung alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.05	0	0	0	
		Glob.	0.16	0.20	0.20	0.20	
Kidney	Kidney 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	19.1	18.5	17.7	17.0	2.1 (11%)
		Glob.	11.8	11.4	11.7	11.6	
	Kidney alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.095	0	0	0	
		Glob.	0.42	0.49	0.48	0.41	
Spleen	Spleen 0.1 cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	17.8	18.0	17.7	17.3	2.9 (20%)
		Glob.	14.1	12.6	12.5	11.2	
	Spleen alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0	0	0	0	
		Glob.	0.29	0.28	0.26	0.25	
Bone-marrow	Bone-Marrow 0. cc. + Serum 0.9 cc.	Alb.	14.5	14.4	14.0	14.3	3.1 (17%)
		Glob.	18.2	16.4	15.8	15.1	
	Bone-Marrow alone 0.1 cc. (calculated)	Alb.	0.08	0	0	0	
		Glob.	0.17	0.23	0.20	0.19	

almost negligible. In table I the value for 0.1 cc. of extract was given.

This first experiment shows, just as was indicated by the former authors, that the cell free organ extracts have no appreciable proteolytic action upon blood proteins.

II. Experiment. Proteolytic action of organ cell suspension upon blood protein.

To examine whether the organ extracts containing cells have any action upon blood protein, the turbid solution obtained by the percolation of the organ pastes through muslin was used in place of the clear extract of the former experiment, and under exactly similar conditions their proteolytic action upon blood protein was examined. The result was shown in Table II.

Although in this experiment, just as in the former one, the albumine of the organ extract, and accordingly also that of the extract mixed in the serum, were more or less precipitated and calculated as if they were globuline; these amounts remained also within the limits of experimental error, the amount of decomposed albumine or globuline in the mixture of serum and extract being much larger in comparison with the decrease in the protein of the controls. Even though the apparent change of albumine to globuline was taken into account, we can perceive a very interesting fact from the result of this experiment that the albumine or globuline of the serum was decomposed differently by the enzymes of respective organs. Namely, enzyme contained in liver and kidney cells, decomposes blood albumine, while that in muscle, bone marrow and spleen splits only blood globuline. In the lung, the enzyme which decomposes blood protein could not be demonstrated.

CONSIDERATION.

The above examination clearly indicates that liver and kidney decompose only serum albumine, while bone-marrow spleen and muscle hydrolyse serum globuline. The degree of activity per unit

volume of the tissue is in the order of liver, bone-marrow, spleen, kidney and muscle. When we consider, however, the size of these organs, the action of hydrolysing blood proteins seems to be localized mainly in liver and muscle, the former hydrolyzing the serum albumine, and the latter splitting off the serum globuline.

SUMMARY.

1. The cell free extract of liver, bone-marrow, spleen, kidney and muscle shows no hydrolyzing action upon the blood proteins.
2. Most of the percolate of the organ paste hydrolyses either the serum albumine or serum globuline. Liver and kidney act only on serum albumine, while muscle, spleen and bone-marrow hydrolyse only serum globuline.
3. The Lung shows scarcely any hydrolyzing action toward blood proteins.

REFERENCES.

- Berger (1922): Zeits. f. gesamt. exp. Med., **28**, 1.
Berger, u. Petscher (1923: *ibid.*, **38**, 258.
Berger, u. Bleyer (1924-1925): *ibid.*, **43**, 58; **45**, 385.
Dernby (1918): Journ. of Biol. Chem., **35**, 179.
Kerr, Hurwitz & Whipple (1918): Am. Journ. Physiol., **47**, 356, 370, 379.
Komatsu (1927): This journal., **7**, 1, 447.
Smith (1894): N.Y. Med. J., **60**, 590 (cited in Euler's Chem. d. Enzyme.)
Smith, Belt & Whipple (1920): Am. J. Physiol., **52**, 54, 72.

SOME INVESTIGATIONS ON THE QUESTION OF THE ORIGIN OF PLASMA PROTEINS.—II.

The relation of hyperalbuminemic and hyperglobulinemic condition to the action of liver and muscle on serum proteins.

BY

JUDO SENSU.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, May 20, 1929.)

In the previous experiment, in which the proteolytic action of various organ ferments upon the blood proteins was examined, it was found that the body organs could be separated into two groups, according to the class of blood proteins (albumine or globuline) which they split. It was also found that among the albumine splitting organs the proteolytic activity of liver was most profound, while muscle was far superior to that of the other globuline splitting organs.

This present study is undertaken on the assumption that if there exists any relation between plasma protein and body organs, the proteolytic activity of the organs which supply blood proteins will change when the distribution of plasma proteins differs from the normal.

There are several kinds of methods of effecting the distribution of protein fractions in blood, such as, by the injection of toxin or protein, or by infecting the animal with some pathogenic micro-organisms. But the most interesting and instructive experiment in the study of the origin of plasma proteins in the plasmapheresis or plasma depletion, in which the rate of regeneration of albumine and globuline differs, inducing at first the hyperalbuminemia, this being following after some time by the hyperglobulinemia. From these methods the following were selected in our experiments.

- 1) For hyperalbuminemia: plasmapheresis.
- 2) For hyperglobulinemia: the injection of typhoid vaccine; the injection of hematoporphyrin and exposure to the sunlight; the late stage of plasmapheresis.

1. *Experiment with the injection of typhoid vaccine.*

Hurwitz and Meyer (1916) studied the effect of immunisation upon the blood proteins and found that the injection of bacteria, living or dead, caused a rise in the content of serum globuline whenever the animal reacted severely to the inoculation, while, when the immunisation was carried out very carefully under a well controlled dosage, the increase in the serum globuline was not usually observed, although the immune bodies in the blood attained a high concentration. The injection of massive doses, according to them, resulted in almost every instance in a marked rise in globuline content, and they concluded that the increase in the blood globuline was usually accompanied by a marked metabolic disorder. In our experiment, in which a typhoid vaccine was used, their result was also confirmed, and only a slight temporary rise in the blood globuline was obtained by the usual immunising doses (1/10 loopful of bacteria), and when the animal received successive injections of massive doses ($\frac{1}{2}$ loopful), the marked and permanent rise in globuline could be observed.

Based upon this result, the following method was adopted. Male white rabbits, weighing about 2500 gm. were injected intravenously with typhoid vaccine every two days, until, when they had received five injections, they were fit for the experiment, the rise of globuline reaching to the value of albumine as shown in Table I. Among the organs of these animals experimented on, a striking change was found in liver and muscle, and the maceration of the latter was especially most remarkable. This fact made one aware of the probable change in the fermentative activity of these organs. When the proteolytic action of various body organs was examined by the method formerly described by the author (Senshu, 1929, I)

TABLE I.

The action of Liver paste (0.1 cc.) on Serum (0.9 cc.)									
Condition	Beginning	I week	II weeks	III weeks	Decrease	Amount of protein present in Liver extract (0.1 cc.) (calculated)			
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	Beginning	I week	II weeks	III weeks
Normal	A. 18.0 G. 15.0	17.4 15.1	16.3 14.7	14.8 14.8	3.2 (18%)	cc. 5.65 G. 0.85	cc. 6.25	cc. 5.38	cc. 5.38
Injection of typhoid vaccine	A. 14.6 G. 11.9	14.0 12.0	13.5 12.2	12.9 12.2	1.7 (12%)	A. 2.06 G. 4.18	5.98	5.79	5.53
Hematoporphyrin injection	A. 27.5 G. 17.8	23.5 18.3	22.4 18.2	21.7 18.0	5.8 (21%)	A. 1.67 G. 6.53	7.90	7.69	7.40
Plasmapheresis (Hyperalbuminemia)	A. 24.0 G. 11.0	21.7 11.6	19.8 12.0	17.5 12.1	6.5 (27%)	A. 2.34 G. 4.01	5.80	5.10	4.61
Plasmapheresis (Hyperglobulinemia)	A. 17.0 G. 9.5	15.7 9.5	14.8 10.9	14.3 9.3	2.7 (16%)	A. 1.40 G. 3.40	4.40	4.00	3.50
The action of muscle paste (0.1 cc.) on serum (0.9 cc.)									
Condition	Beginning	I week	II weeks	III weeks	Decrease	Amount of protein present in Muscle extract (0.1 cc.) (calculated)			
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	Beginning	I week	II weeks	III weeks
Normal	A. 22.8 G. 15.6	22.6 15.1	22.5 14.5	22.7 14.0	1.6 (10%)	cc. 1.38 G. 2.69	cc. 3.90	cc. 3.85	cc. 3.75
Injection of typhoid vaccine	A. 12.9 G. 11.9	12.5 11.8	12.5 11.8	12.4 10.3	2.2 (18%)	A. 2.25 G. 1.99	4.05	3.90	3.68
Injection of Hematoporphyrin	A. 27.3 G. 17.4	27.0 16.0	27.0 15.0	26.8 14.2	3.2 (18%)	A. 1.22 G. 2.45	2.05	1.80	1.70
Plasmapheresis (Hyperalbuminemia)	A. 20.0 G. 15.4	20.3 14.6	20.1 14.3	20.0 13.5	1.9 (12%)	A. 1.85 G. 2.02	3.33	3.06	3.05
Plasmapheresis (Hyperglobulinemia)	A. 15.5 G. 11.0	15.5 10.3	15.5 18.8	15.0 8.0	3.0 (28%)	A. 2.42 G. 1.33	3.40	3.20	2.70

A. Albumin. G. Globulin
(N. in term of N/100 NaOH)

it was found that, while the activity of other organs except liver and muscle remained almost at the normal value, that of these two organs suffered a marked change as is shown table I.

As the table indicates, the albumine-splitting power of liver enzyme was held back in a slight degree, while on the other hand that of the muscle was augmented.

The protocol of the animal experimented on is shown in table II.

TABLE II.

	Before injection	III days	V days	VII days	IX days	IX days
Blood per 1 cmm.						
Red corpuscles	5.76 mil.	5.68 mil.	5.20 mil.	5.40 mil.	4.96 mil.	4.88 mil.
White "	9200	9500	7300	8200	8600	8000
Hemoglobin	75%	68%	67%	66%	68%	60%
Serum per 100 cc.						
Total protein N.	891.4 mg.	879.2 mg.	973.0 mg.	989.5 mg.	963.8 mg.	984.2 mg.
Albumine N.	568.4	564.2	516.6	539.0	506.0	516.6
Globuline N.	323.0	315.0	456.4	450.0	457.8	467.6
Albumine/globuline	1.8	1.8	1.1	1.2	1.1	1.1

(Body weight decreased from 2500 gm. to 2200 gm.)

II. Experiment with the injection of hematoporphyrin and exposure to the sunlight.

Dr. Komatsu (1927) traced the change of plasma proteins with the changes in hemoglobin and blood corpuscles content in rabbits which were injected with a certain amount of hematoporphyrin (0.05 gm. per 1 kilo of body weight) and were exposed to the direct sunlight, and found the ratio of albumine to globuline in their blood considerably diminished (hyperglobulinemia): He also found that together with this change of protein distribution in the blood there was a marked change in the proteins of liver and muscle, and surmised the close relationship between the proteins of blood plasma and those of the liver and muscle.

As these facts suggest to us the probable changes in the enzymic activity of liver and muscle, the same line of research was undertaken as in the former experiment. The result shows that also in the case of hematoporphyrin hyperglobulinemia the enzymic activity of the muscle greatly increased, while that of liver was rather decreased. (See Table I).

The hematoporphyrin hydrochlorid was prepared after Nencki and Zaleski, dissolved in sterilized saline solution, and was injected subcutaneously just as was done by the former authors, and the animals were exposed daily for two hours in the direct sunlight of sunny September days. The blood of the animal was examined daily, and when the rise of globuline content was clearly observable, that is, after three days in our case, the activity of enzyme of their organs was examined by the method described in the former communication. The protocol of the experimental animal is shown in Table III.

TABLE III.

	Before injection	II days	III days
Blood per 1 cmm.			
Red Corpuscle	5.50 mil.	4.88 mil.	4.75 mil.
Hemoglobin	75%	72%	68%
Serum per 100 cc.			
Total protein N.	893.1 mg.	284.9 mg.	817.4 mg.
Albumine N.	505.4	506.8	429.1
Globuline N.	297.7	278.1	388.3
Albumine globuline	1.6	1.8	1.2

(Body weight decreased from 2550 gm. to 2300 gm.)

III. EXPERIMENT WITH PLASMAPHARESIS.

In the study on the regeneration of plasma proteins after blood-letting and replenishing the loss of the blood by the suspen-

sion of the blood cells in Ringer's solution, Morawitz (1906) found that the hyperalbuminemia which appeared directly after the operation, was shortly succeeded by hyperglobulinemia. Whipple and his co-workers (1920), also using this method, found the regeneration of plasma proteins delayed in case of liver injury, —an interesting observation in regard to the study on the question of the origin of plasma proteins.

While in the previous methods of producing the change in the distribution of plasma protein fractions such as the injection of toxin, hematoporphyrin, etc., there is fear enough that the operation might cause a serious disturbance within the body of the animal, the change of the albumine or globuline content in the blood by the plasmapheresis seems to be conducted in the least injurious way and the result of the examination of organ enzymes under this condition is most satisfactory.

The experiment was conducted in the following manner; exactly half of the quantity of the whole blood of rabbits, calculated from their body weight, was taken out from the carotid artery of one side and the same amount of blood cell suspension was injected into the jugular vein. The suspension ought to contain the normal number of blood cells. None of the rabbits suffered from any kind of shock during the operation and the hemoglobin content of their blood remained thereby unchanged. The regeneration of blood plasma following the operation was quite equal in all cases and took place in a way similar to that reported by the former authors; the hyperalbuminemia begins at twenty hours after the operation and lasts about one and half days, the globuline gradually rising to reach its highest value on about the fifth or sixth days, as is shown in Table IV. When the highest value of each fraction of plasma proteins was obtained in each stage, the activity of their organ ferments was examined.

The results, which are also tabulated in table 1, clearly indicate the following facts.

TABLE IV.

Plasmapheresis	Content in 100 cc. serum			$\frac{\text{Albumine N.}}{\text{Globuline N.}}$
	Total N.	Albumine N.	Globuline N.	
	mg.	mg.	mg.	
Before	1325.4	988.1	337.3	2.9
Direct after	497.5	375.5	122.0	3.1
2 days "	935.6	687.7	247.9	2.7
3 " "	1061.8	833.9	227.9	3.7
4 " "	1253.7	790.5	463.2	1.7
5 " "	1141.3	643.1	498.2	1.4
6 " "	1138.4	671.1	467.3	1.4
7 " "	1101.9	552.7	549.2	1.0

Hyperalbuminemic stage: The organs of the animal showed no visible change and the enzymic activity of the ferments of organs except liver remained almost at the normal value. The action of the liver enzymes however, was greatly augmented. (See Table I.)

Hyperglobulinemic stage. Of the proteolytic action of ferments of the organs of the animal in this stage, the increased activity was observed in the muscle enzyme only. The increased activity of the liver enzyme, found in the early stage of the blood plasma regeneration, returned to the normal value at this stage. (See Table I.)

DISCUSSION.

In the present experiment, the proteolytic activity of various organ ferments upon the plasma proteins was examined under the abnormal distribution of plasma proteins, produced experimentally, and the results obtained showed considerable regularity in their actions; namely, whenever a rise in the albumine content of the plasma proteins occurred, the activity of liver enzyme was enhanced, while in the case of hyperglobulinemia, the increased activity of the muscle enzyme was always observable.

This fact was very suggestive of a close relationship existing between liver and blood albumine and on the other hand between muscle and blood globuline. And this supposition becomes still more probable, when we compare the relative amounts of albumine and globuline extractable from liver and muscle in each case as is shown in the table V.

TABLE V.

Amount of albumine and globuline extractable from liver and muscle.

Condition	Liver			Muscle		
	Albumine fraction	Globuline fraction	Ratio A/G	Albumine fraction	Globuline fraction	Ratio A/G
Normal	cc. 0.85	cc. 5.65	cc. 0.4	cc. 1.58	cc. 2.69	cc. 0.8
Haematoporphyrin injection	1.67	6.53	0.3	1.22	1.23	1.0
Plasmapheresis (Hyperalbuminemia)	0.58	5.95	0.1	1.85	2.02	0.9
Plasmapheresis (Hyperglobulinemia)	1.40	3.40	0.4	2.42	1.33	1.8
Injection of typhoid vaccine	1.37	2.78	0.5	1.50	1.29	1.2

These changes indicate that the amount of globuline found in a great proportion in the extract of muscle in normal conditions became less in every case of hyperglobulinemia, while the ratio of albumine to globuline normally observed in the liver extract was decreased when the hyperalbuminemia took place. These facts suggest to us the increased output of albumine from the liver and of the globuline from the muscle in hyperalbuminemia and hyperglobulinemia respectively. To ascertain this relation more clearly, analysis of the organ proteins under these conditions is desirable. The direct method, however, of using various kinds of solvents to extract these proteins, attempted by many authors was open to discussion and any conclusion deduced from their result could not be relied upon, while on the other hand, the indirect analysis, used

by Dr. Komatsu in examining the S:N ratio of tissue proteins to know the qualitative change of albumine and globuline, threw a new light on this field. He found in the hematoporphyrin rabbits, in the blood of which hyperglobulinemia took place, the increase of the S:N ratio of the muscle, and thought it proof that the protein of globulin nature in the muscle had decreased. In what direction this ratio S:N of the liver and muscle tissue will move, with the change of proportion of albumin and globulin in the blood plasma in our cases, will be discussed in the next report.

SUMMARY.

1. The abnormal ratio of blood albumin to the blood globulin was produced by several methods and the proteolytic activity of various tissues toward the serum proteins was compared.

2. Proteolytic activity of liver is always increased in the case of hyperalbuminemia, while that of muscle is enhanced greatly whenever hyperglobulinemia occurs.

REFERENCES.

- Komatsu (1927): *This Journal*, **7**, 1, 447.
Morawitz (1906): *Hofmeister's Beitr.*, **7**, 153.
Nencki. Zaleski (1900): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **30**, 384.
Senshu (1929): *This Journal*, **11**, 47.
Smith, Belt & Whipple (1920): *Am. J. Physiol.*, **52**, 54, 72.

SOME INVESTIGATIONS ON THE QUESTION OF THE ORIGIN OF PLASMA PROTEINS.—III.

The nitrogen and sulphur content of liver and muscle in hyperalbuminemic and hyperglobulinemic condition.

By

JUDO SENSU.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, May 20, 1929.)

It is stated in the second report, that either the albumine of the liver or the globuline of the muscle decreases in amount according to the appearance of either hyperalbuminemia or hyperglobulinemia, and that it is accompanied with the augmentation of enzymic activity of respective organ for blood albumine blood globuline. For the supposition that these tissues may act as the source of blood proteins another proof may be added from the consideration of N:S ratio of the tissue proteins examined under various conditions of plasma proteins.

For the determination of nitrogen and sulphur content of the tissue proteins the method used by Dr. Komatsu was followed: The blood vessel of the animal, at the period when the ratio of albumine-globuline in blood reached the desired value, was washed out by the saline solution as already described, and the liver and muscle were taken out, minced and kept in 95% alcohol overnight. The organ powder was then well drained, extracted with alcohol and ether successively each for twenty hours in a Soxhlet's apparatus, finely powdered in a mortar, pushed through a fine sieve and dried in the oven. The powder thus obtained was analysed; the nitrogen content, by Kjeldahl's method and the sulphur content, by Benedict-Denis' method.

The results are shown in Table I. As the results of experi-

ment in the same condition coincided so well with each other in the organ of the animal when calculated in the N:S ratio of the tissue proteins, the discrepancy only occurring at the figure of fourth decimal, the average values of their amount were given in the table. In addition to these figures, to know the change of liver and muscle as a whole, the percentage of liver and gastrocnemius muscle to the whole body in weight and the water content of each organ was estimated in every animal and was also shown in the table.

TABLE I.

Condition	Blood albumine- globuline ratio	Liver			Muscle		
		Weight	Water content	S/N	Weight	Water content	S/N
Normal	3:1	1,9%	73,9%	0.059	0,40%	73,2%	0.045
Immunisation with typhoid vaccine	1:1	2,4%	75,0%	0.054	0,24%	75,6%	0.047
Plasmapheresis (hyperalbuminemia)	4:1	2,6%	75,6%	0.054	0,38%	73,6%	0.045
Plasmapheresis (hyperglobulinemia)	1,1:1	2,7%	75,0%	0.057	0,29%	75,0%	0.048

1. EXPERIMENT WITH THE INJECTION OF TYPHOID VACCINE.

(*Hyperglobulinemia.*)

The change of the ratio S:N of liver and muscle under this condition was found in quite an opposite direction, namely the the ratio of the liver proteins became less, while that of the muscle increased, showing clearly the decrease of protein rich in sulphur (albumine nature) in the liver, and the decrease of protein poor in sulphur (globuline nature) in the muscle. In this case, furthermore, the decrease in weight of muscle was quite remarkable which could be interpreted as another proof of decrease of proteins from the muscle.

2. EXPERIMENT WITH THE PLASMAPHARESIS.

A. Hyperalbuminemic phase.

Only the S:N ratio of the liver proteins changed in this case, while that of the muscle remained normal, the fact showing decrease of protein of albumine nature in the liver and no change in proteins of muscle. The weight of muscle had likewise no appreciable change.

B. Hyperglobulinemic phase.

The analyses of liver and the muscle of the rabbits, examined when the blood plasma regeneration proceeded and the hyperglobulinemia occurred, resulted in the change in the S:N ratio of both organs. The ratio S:N of the liver proteins was on the way to recovery, but did not yet reach the normal value, while that of the muscle proteins which had been normal in the early stage of plasma regeneration became increased. This result could be regarded as the decrease of globuline from the muscle tissue. The weight of muscle also considerably decreased.

CONCLUSION.

In the above experiments in which the changes of proteolytic activity of liver and muscle enzymes, together with the changes of S:N of these organs at the time of disturbed distribution of plasma proteins, were examined, the following interesting results were obtained.

1) In case of hyperalbuminemia where the increased activity of liver in digesting plasma albumine was observed, the ratio S:N of the proteins of this organ is decreased.

2) On the other hand, the increased proteolytic action of the muscle cells upon the blood globuline as well as the increase in the ratio S:N of the proteins always accompanys the increase of globuline content of the plasma.

From these findings, together with the considerations that

both these organs are rich in proteins, one may be allowed to forward the opinion that the liver and muscle play a definite rôle in regulating the production or utilization of the plasma proteins and that, when necessary, the liver supplies the ingredient for blood albumine, while the muscle puts forth the materials for the recovery of globuline of the plasma.

In conclusion, I should like to record my gratitude to Prof. S. Kakiuchi for his advice and interest throughout this series of work.

REFERENCES.

- Komatsu (1927): This Journal, 7, 153.
Senshu (1929): This Journal, 11, 55.

BEITRAG ZUR UNTERSUCHUNG DER HÄMOLYTISCHEN WIRKUNG DES SAPONINS.

VON

KAZUO HARA.

(Aus dem Laboratorium des Kyoundo-Hospitals zu Tokio.)

(Eingegangen am 19. Juni 1929.)

Die intensiv d.h. noch in grosser Verdünnung hämolysierende Wirkung des Saponins wurde schon im Jahre 1887 durch Kobert gefunden und sogar späterhin von ihm selbst als Mittel zur Gehaltbestimmung von Saponindrogen vorgeschlagen. Um in das Wesen der Hämolysen näheren Einblick zu gewinnen, wurden von alters her zahlreiche Berichte auch über die Saponinhämolysen erstattet. Nachdem Hedon konstatiert hatte, dass dem Blutserum saponinhämolysenhemmende Wirkung zukommt, wurde 1901 von Ransom gefunden, dass das Cholesterin dieselbe Wirkung entfaltet, dann von Windaus, dass das Digitonin, eine Art von Saponin, durch Bildung einer Additionsverbindung mit Cholesterin sein Hämolysierungsvermögen einbüsst. Auch Yagi hat eine gleichartige nicht hämolytisch wirkende Additionsverbindung von Diosein dargestellt. Die beiden letzteren Autoren haben der Ansicht von Ransom eine Stütze gegeben, dass das Wesen der Saponinhämolysen in der Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Erythrocytenmembran durch Verbindung des Saponins mit dem Cholesterin der roten Blutzellen besteht, und dass die hämolysenhemmende Wirkung des Serums dadurch zustande kommt, dass sich das im letzteren in einer geringeren Menge vorkommende Cholesterin zuerst mit dem Saponin verbindet, somit den Erythrozyten die Saponinschädigung entzieht. Allein nach den Untersuchungen von Bechhold, Hattori u. a. besteht die Blutkörperchenmembran aus einem netzförmigen (retikulären) Gerüst und einer dessen Netzmaschen ausfüllenden

homogenen Schicht, die ein aus Cholesterin und Lezithin zusammengesetztes Kolloid darstellt. Das in diesem Kolloidalsystem enthaltene Lezithin entquillt durch die Wirkung des Saponins, nach Verlust des vitalen Quellungszustandes. Infolgedessen zeigt sich zwischen dem Cholesterin und dem Lezithin das Entmischungsphänomen und dies soll als das Wesen der Hämolyse zu betrachten sein. Auch hat Ōta, nachdem er experimentell bestätigt hatte, dass das Verbindungsvermögen des Saponins mit dem Cholesterin mit seiner hämolysierenden Wirkung nicht gleichen Schritt hält, dieser Ansicht zugestimmt.

Die Resistenz der roten Blutkörperchen, die sich durch die H^+ -Konzentrationen beeinflussen lässt, ist bei der neutralen Reaktion am stärksten und wird von da an nach der sauren oder alkalischen Seite weniger stark; übereinstimmend damit stehen die Permeabilitätsgeschwindigkeit und die Adsorption in einer bestimmten Beziehung zu den H^+ -Konzentrationen. Nach Bethe sollen die beiden beim Durchgang der Farbstoffe durch Pergamentpapier in Wasser oder Eiweissol durch die H^+ -Konzentrationen des Mediums in hohem Grade beeinflusst werden. Sie werden nämlich bei dem Versuche mit sauren resp. alkalischen Farbstoffen bei der sauren resp. alkalischen Reaktion gesteigert, aber bei der alkalischen resp. sauren herabgesetzt. Beim Stoffwechsel der lebenden Zellen oder Gewebe findet sich gleiches Verhalten. Nach Mommsen zeigt sich dieser Zusammenhang beim Adsorptionsphänomen, während die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe sich umgekehrt verhält. Es nimmt nämlich die Geschwindigkeit bei den sauren Farbstoffen bei der Diffusion in saurem Gelatin ab, aber bei der in alkalischem Gelatin zu. Bei den alkalischen Farbstoffen ist das Verhalten entgegengesetzt.

Vergegenwärtigt man sich die obigen Tatsachen, so lässt sich unschwer vermuten, dass die Saponinhämolyse durch die H^+ -Konzentrationen beeinflussbar ist.

Durch die Untersuchungen in der letzten Zeit ist deutlich klargestellt worden, dass die Körpergewebe durch verschiedenar-

tige pathologische Veränderungen manchmal in ihren H^+ -Konzentrationen, sei es lokal oder sei es vorübergehend verändert werden. Es werden nämlich z. B. das Nervengewebe bei der Avitaminose (Kato, Akiba, Inoguchi), ferner das Gewebe bei der Azidose, das Exsudat bei der akuten Entzündung oder der Eiter alle in den H^+ -Konzentrationen gesteigert. Die Untersuchung, ob in diesen Geweben mit so vermehrten H^+ -Konzentrationen die Zellschädigung durch dasselbe Gift *ceteris paribus* weitaus intensiver wird als in den normalen, ist auch in pathophysiologischer Hinsicht von Interesse. Untersuchungen über die Saponinhämolyse im mit verschieden starken H^+ -Konzentrationen versehenen Medium wurden früher von Walbum und neuerdings auch von Mond angestellt. Sind auch die Resultate der beiden Autoren mehr oder weniger verschieden, so stimmen Sie doch überein in dem Punkte, dass die Saponinhämolyse in ihrer Stärke weitgehend von der H^+ -Konzentration des Mediums abhängig ist.

Wir haben aber über dieses Thema nur eine spärliche Literatur. Im Jahre 1909 hat Takaoki Sasaki am Schluss seiner unter dem Titel "Über die Beförderung der hämolytischen Wirkung des Serums durch Aminosäuren" veröffentlichten Arbeit gezeigt, dass die Aminosäuren auf die hämolytische Wirkung von Säuren, Alkalien, Lezithin, Cholesterin, ölsaurem Natrium etc. hemmend, aber auf eine solche von Saponin vielmehr befördernd wirken. Damals waren aber die Methoden zur Messung der H^+ -Konzentrationen noch nicht allgemein in der Biologie eingebürgert, auch standen uns die einfachen Apparate, die jetzt im Gebrauch sind, nicht zur Verfügung, sodass Versuche in dieser Richtung unterblieben sind. Es blieb mithin die wichtige Frage unbeantwortet, ob die befördernde Wirkung der Aminosäuren auf die Saponinhämolyse etwa auf ihrer Molekühlwirkung wie z. B. der Hemmung des Cholesterins beruht oder ob es sich nur einfach um Verschiebung der Ph des Mediums handelt. Um dieses Problem näher zu untersuchen, habe ich die folgenden Experimente angestellt.

VERSUCHSANORDNUNG.

1. 10.0 mg Saponin "Kahlbaum" löste ich in 0.85% iger Kochsalzlösung, und füllte das Ganze auf 100.0 ccm (Da die Saponine noch nicht chemisch rein dargestellt werden, und in der Literatur vielfach Saponin "Kahlbaum" zur Untersuchung gebraucht wurde, und auch Sasaki mit Saponin "Kahlbaum" gearbeitet hat, habe ich zum Vergleichszweck auch dasselbe Präparat benutzt.) Obige Lösung diente als Standardlösung, und wurde wie folgt verdünnt:

Nr	Standardlösung (10.0 mg: 100.0 ccm)	0.85%ige NaCl-Lösung	Menge d. Saponins in 1.0 ccm
1	6.0 ccm	4.0 ccm	0.06 mg
2	5.0	5.0	0.05
3	4.0	6.0	0.04
4	3.0	7.0	0.03
5	2.0	8.0	0.02

Von den Saponinlösungen jeder Reihe wurde je 1.0 ccm gebraucht; die darin enthaltene Saponinmenge ist in der 4ten Kolumne angegeben.

2. Die Erythrocytenemulsion wurde aus dem einem Kaninchen durch Herzpunktion entnommenen Blute dadurch hergestellt, dass ich das Blut nach hinreichender Defibrinierung zur völligen Wegschaffung der hemmenden Wirkung des Serums fünfmal mit physiologischer Kochsalzlösung wusch, dann im Verhältnis von 5% in physiologischer Lösung aufschwemmte. In diesem Versuche wurde davon 1.0 ccm verwendet.

3. Als Puffer wurden von mir Glykokoll, Asparagin oder Phosphate gebraucht.

Asparagin "Kahlbaum" und Glykokoll "Kahlbaum" löste ich in physiologischer Lösung zu M/10-Lösung, welche ich als

Standardlösung gebrauchte. Ich habe zu dieser Lösung die durch Lösen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellte N/10 Natronlauge oder HCl-Lösung in verschiedenen grossen Mengen hinzugefügt und dadurch folgende verschiedene Lösungen bekommen:

1.	M/10 Asparaginlösung	Asparagin 1.
2.	M/10 Asparaginlösung	97.5 ccm	}Asparagin 2.
	M/10 NaOH-Lösung	2.5	
3.	M/10 Asparaginlösung	95.0	}Asparagin 3.
	N/10 NaOH-Lösung	5.0	
4.	M/10 Asparaginlösung	80.0	}Asparagin 4.
	N/10 NaOH-Lösung	20.0	
5.	M/10 Asparaginlösung	60.0	}Asparagin 5.
	N/10 NaOH-Lösung	40.0	
6.	M/10 Glykokollösung	Glykokoll 1.
7.	M/10 Glykokollösung	95.0	} Glykokoll 2.
	N/10 HCl-Lösung	5.0	
8.	M/10 Glykokollösung	95.0	}Glykokoll 3.
	N/10 NaOH-Lösung	5.0	
9.	M/10 Glykokollösung	90.0	}Glykokoll 4.
	N/10 NaOH-Lösung	10.0	

Als Phosphatpuffer benutzte ich KH_2PO_4 "Kahlbaum, nach Sörensen" und $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ "Kahlbaum, nach Sörensen," löste diese beiden in dest. Wasser zu M/15 nach Jarisch und habe zu dieser Lösung die durch Lösen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellte N/10 HCl- oder NaOH-Lösung in verschieden grossen Mengen wie folgend hinzugefügt:

1)	Phosphatgemisch	100 ccm	}Phosphatgemisch 1.
	N/10 HCl-Lösung	70	
2)	Phosphatgemisch	100	}Phosphatgemisch 2.
	N/10 HCl-Lösung	60	
3)	Phosphatgemisch	100	}Phosphatgemisch 3.
	N/10 HCl-Lösung	40	

- 4) Phosphatgemisch 100 } Phosphatgemisch 4.
 N/10 HCl-Lösung 20 }
 5) Phosphatgemisch Phosphatgemisch 5.
 6) Phosphatgemisch 100 } Phosphatgemisch 6.
 N/10 NaOH-Lösung 20 }
 7) Phosphatgemisch 100 } Phosphatgemisch 7.
 N/10 NaOH-Lösung 40 }
 8) Phosphatgemisch 100 } Phosphatgemisch 8.
 N/10 NaOH-Lösung 60 }
 9) Phosphatgemisch 100 } Phosphatgemisch 9.
 N/10 NaOH-Lösung 70 }

4. Beim Versuch setzte ich zu 3.0 ccm verschiedener Pufferlösungen 1.0 ccm verschieden stark konzentrierter Saponinlösungen, dann 1.0 ccm Erythrocytenemulsion zu, so dass die Gesamtmenge 5.0 ccm betrug und die roten Blutkörperchen darin im Verhältnis von 1% enthalten waren.

5. In jeder auf diese Weise erhaltenen Mischlösung mass ich die H^+ -Konzentrationen nach der Gaskettenmethode.

6. Die Stärke der Hämolyse wurde nach zweistündigem Stehenlassen dieser Mischlösungen im Brutofen vergleichend beobachtet.

VERSUCHSRESULTATE.

Versuch I. Versuch mit dem Phosphatgemisch.

Phosphatgemisch		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9
Ph		4.30	5.46	6.11	6.47	6.66	6.98	7.29	7.85	8.61
Saponin- menge in 5.0 ccm	mg									
	0.02	卅	卅	±	—	—	—	—	—	卅
	0.03	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅	卅
	0.05	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	0.06	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	0	±	—	—	—	—	—	—	—	—

Versuch II. Versuch mit Glykokoll.

Glykokollösung		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Ph		4.30	6.90	8.16	8.51
Saponin- menge in 5.0 cem	mg 0.02	卅	—	—	±
	0.03	卅	+	卅	卅
	0.05	卅	+	卅	卅
	0.06	卅	卅	卅	卅
	0	±	—	—	—

Versuch III. Versuch mit Asparagin.

Asparaginlösung		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
Ph		5.29	7.15	7.47	8.30	8.91
Saponin- menge in 5.0 cem	mg 0.02	卅	—	—	±	+
	0.03	卅	±	±	卅	卅
	0.05	卅	+	+	卅	卅
	0.06	卅	+	+	卅	卅
	0	—	—	—	—	—

Versuch IV. Vergleich unter verschiedenen Pufferlösungen.

Art d. Pufferlösung		Glykokollösung Nr. 1	Asparaginlösung Nr. 2	Physiologische NaCl-Lösung
Ph		7.02	7.15	7.33
Saponinmenge	mg 0.02	—	—	—
	0.03	±	±	±

Die Stärke der Hämolyse, von der vollkommen aufgetretenen bis zur ausgebliebenen Hämolsierung, wird durch III bis — bezeichnet.

Aus den oben angegebenen vier Versuchen, die mehrmals wiederholt an dem Blut verschiedener Kaninchen angestellt wurden haben sich im grossen u. ganzen mit einander übereinstimmende Resultate ergeben.

SCHLUSS.

1. Nach den obigen Ergebnissen lässt sich die hämolytische Wirkung des Saponins durch die H^+ -Konzentrationen des Mediums beeinflussen: Bei den neutralen Reaktionen d. h. in der Nähe von Ph 7.0 zeigt sie sich am schwächsten, und verstärkt sich von da an mit dem Fortschreiten nach der sauren oder alkalischen Seite immer mehr.

2. Dass diese Beförderung nicht durch das Asparagin oder Glykokoll selbst zustande kommt, erkennt man daraus, dass auch eine Lösung, die eine gleiche Menge Asparagin oder Glykokoll enthält, je nach der verschieden grossen H^+ -Konzentration verschieden starke Saponinhämolyse bewirkt, und im Medium mit gleichen H^+ -Konzentrationen, trotz Gegenwart der Aminosäure Saponinhämolyse gleich wie in physiologischer Kochsalzlösung stattfindet.

Zudem befördern die oben genannten beiden Aminosäuren nicht die unten zu erwähnende Säurenämolyse, sondern zeigen vielmehr eine Neigung zur Hemmung derselben.

3. Auch im Phosphatgemisch findet die Saponinhämolyse statt, im grossen u. ganzen gleich wie in anderer Pufferlösung.

Versuch V. Versuch über die Säurenämolyse.

1. Ich löste 7.0023 g Zitronensäure ($C_6H_8O_7 + H_2O$) in physiologischer Lösung, füllte das Ganze auf 1000.0 ccm und verdünnte diese Lösung auf folgende Weise:

	N/10 Acidum citricum	physiolog. Kochsalzlösung
Nr. 1	10.0 cem	0 cem
2	9.0	1.0
3	8.0	2.0
4	7.0	3.0
5	6.0	4.0
6	5.0	5.0
7	4.0	6.0
8	3.0	7.0
9	2.0	8.0
10	1.0	9.0

2. Von diesen verschiedenen Lösungen fügte ich je 1.0 ccm zu 3.0 ccm physiologischer Kochsalzlösung, M/10 Asparaginlösung oder M/10 Glykokollösung (beide mit physiolog. Kochsalzlösung hergestellt), danach je 1.0 ccm 5% iger Erythrocytenaufschwemmung hinzu, liess das Ganze 2 Stunden im Brutschrank stehen, wonach

Puffer- lösung		Hinzugefügte Zitronensäurelösung (je 1.0 ccm)									
		Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10
Physiolog. Kochsalz- lösung	Ph	3.28		3.57			3.94		4.11		4.68
	n. 2 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±
	n. 24 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±
M/10 Glykoll- lösung	Ph	3.68		3.93			4.21		4.51		4.92
	n. 2 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	±	-
	n. 24 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-
M/10 Asparagin- lösung	Ph	3.55		3.84			4.11		4.39		4.79
	n. 2 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	±	-
	n. 24 Std.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-

ich die Hämolysestärke beobachtete; nach weiterem 24 stündigem Stehenlassen in Zimmertemperatur beobachtete ich dieselbe wieder vergleichend.

Durch wiederholte Untersuchungen habe ich festgestellt, dass die einfache Säurehämolyse durch Aminosäure (Asparagin oder Glykokoll) infolge der Verschiebung der H^+ -Konzentration nach dem neutralen Punkte gehemmt wird. Wenn das Medium in die gleiche H^+ -Konzentration gesetzt wird, so geht die Säurehämolyse trotz Gegenwart der Aminosäure ganz unbeeinflusst von statten.

LITERATUR.

- Akiba, R. (1923): Zikazasshi, Nr. 275.
Beechbold, H. (1921): Münch med. Wochenschrift 68.
Bethe, A. (1922): Biochem. Zeitschr., 127.
Clark, W. M. (1925): Determination of Hydrogenionconcentration.
Hattori, K. (1921): Biochem. Zeitschr., 119.
Hedon, zit. nach Ōta.
Inoguchi, T. (1927): Ijikoron, Nr. 774.
Jarisch, A. (1922): Pflügers Archiv., 192.
Kato, G., Schizume, S. u. Maki, R. (1921): Keio-Igaku 1.
Kato, G. Physiologie.
Kobert, R. (1887): Arch f. exp. Pathol. u. Pharm., 23.
Kobert, R. (1912): Berichte d. deutsch. pharmaz. Ges., 22.
Kofler, L. Die Saponine.
Mommson, H. (1926): Biochem. Zeitschr. 168.
Mond, R. (1925): Pflügers Archiv. f. d. g. Physiologie, 208.
Ōta, K. (1924): Keio-Igaku, 4.
Ransom, F. (1901): Deutsch. med. Wochenschrift., 13.
Sasaki, T. (1909): Biochem. Zeitschrift, 16.
Walbum, L. E. (1914): Biochem. Zeitschrift, 63.
Windaus, A. (1909): Berichte d. deutsch. chem. Ges., 42.
Yagi, S. (1910): Kyoto Igaku Zasshi, 7.

ÜBER DAS VERHALTEN DES GLUKOSEUREIDS IM TIERKÖRPER, UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES BLUTZUCKERS.

VON

KAZUO WATANABE.

(Aus dem Sasaki-Laboratorium zu Tokio.)

(Eingegangen am 19. Juni 1929.)

Glukose und Harnstoff, die beiden ubiquitären Substanzen im Organismus, spielen bekanntlich in der Ernährung und bei den Stoffwechselforgängen höchst massgebende Rollen und treffen somit sehr häufig im Organismus zusammen; so sind sie z.B. im Blut nie vermisste Bestandteile. Dabei ist daher die Bildung der chemischen Verbindung Glukoseureid, $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CH:N.CO.NH}_2$, theoretisch nicht ganz von der Hand zu weisen. Allerdings ist das Vorkommen bis heute weder analytisch noch experimentell bewiesen worden. Aber auch vorausgesetzt, dass solche Verbindung im Tierkörper normalerweise nicht vorhanden ist, ist es doch noch sehr interessant, zu untersuchen, wie sich solche strukturechemische Verbindung im Tierkörper verhält und es ist zugleich auch für die Erforschung des intermediären Kohlenhydrat- und Eiweissstoffwechsels von gewisser Bedeutung.

Im Jahre 1903 veröffentlichte M. N. Schoorl eine ausführliche Arbeit über die Darstellung von Glukoseureid. Später stellte E. Fischer (1914) die Substanz auf dem Umweg über Acetobromglukose dar. Kürzlich veröffentlichten B. Helferich und W. Kosche (1926) eine neue synthetische Methode, welche einfacher als die vorigen Methoden ist. Schon im Jahre 1909 beschäftigte sich auch P. Mayer mit dieser Substanz und konstatierte dabei, dass die Glukose in einem zuckerhaltigen Harn selbst nach längerem Stehenlassen mit dem stets vorhandenen Harnstoff nicht in chemische Bindung eingeht und andererseits experimentell ein Teil des injizierten Glukoseureids sich unverän-

dert im Harn nachweisen lässt. Die damalige Untersuchung war aber leider nur auf das Gebiet des Harns beschränkt und verfolgte nicht das Schicksal des Glukoseureids im Blut.

Durch die bedeutenden Fortschritte der Mikromethodik in der neueren Zeit wurde die Untersuchung der verschiedenen Blutbestandteile sehr erleichtert. Es wurde jetzt infolge der ununterbrochenen Forschung auf dem Gebiete des Blutzuckers allgemein anerkannt, dass die Ermittlung des freien Blutzuckers allein nicht genügt, das Verhalten des Blutzuckers im Organismus zu erkennen, sondern dass die des gebundenen Zuckers (resp. "Sucre protéidique") dabei auch höchst wünschenswert ist. Die Entdeckung des Insulin gab auf verschiedenen Gebieten der Biologie grosse Anregung, besonders bildete sie auf dem Gebiete des Kohlenhydratstoffwechsels eine neue Epoche.

Zuerst untersuchte ich an normalen Kaninchen, wie die Blutzucker (freie, gebundene s. Corps réducteurs hydrolysants und gesamte) und der Blutharnstoff bei der Darreichung von Glukoseureid sich verhalten. Weiter bestimmte ich verschiedene Substanzen im Harn quantitativ, um das Schicksal des zugeführten Glukoseureids zu eruieren. Sodann beschäftigte ich mich mit der Frage, wie das insulinhypoglykämische Kaninchen bei der Zufuhr des Glukoseureids sich verhält, da Insulin nach Lesser, Dale und Cori Zuckerverbrennung und Glykogenbildung in der Muskulatur beschleunigt. (zit. nach Staub). Es fragte sich ferner, wie die Zufuhr von Glukoseureid auf hungernde Kaninchen wirkt. Beim hungernden Kaninchen haben alle Nährdepots bis zu einem minimalen Wert abgenommen und die Oxydationsvorgänge sind beschränkt. Man kann an drei Möglichkeiten denken: erstens könnte sich das Kaninchen gegen Glukoseureid wie bei normalen Zustände verhalten, zweitens stärker reagieren als bei normalem Zustände, um sein abgenommenes Depot zu ersetzen, drittens wegen der Herabsetzung der Zuckerassimilationskraft (Bang) und möglicherweise auch des Abbauvermögens das Glukoseureid weniger als bei dem normalen Zustände verwerten.

Experimenteller Teil.

Zur Darstellung von Glukoseureid wandte ich die Methode von Helferich und Kosche an und verglich die Eigenschaften des Präparates mit den Angaben von Schoorl, um die Identität des Präparates zu bestätigen.

Zur quantitativen Bestimmung des Glukoseureids gebrauchte Mayer den Polarimeter. Schon Schoorl gab an, dass Glukoseureid fast total in Glukose und Harnstoff spaltet, wenn es in kleinen Mengen in 1/10 normaler Schwefelsäurelösung aufgelöst und auf dem Wasserbade mit dem Rückflusskühler 10 Stunden gekocht wird. Ich behandelte Glukoseureid in gleicher Weise und bestimmte die abgespaltene Glukose (nach Pavy-Kumagawa-Suto (1907) und den Harnstoff (nach van Slyke und Cullen, 1913) quantitativ, woraus ich die Menge des Glukoseureids errechnete. Da das Blut, der Harn, die Körperflüssigkeit u. dgl. pufferartig wirkende Substanzen enthalten, so muss man bei der exakten Bestimmung je nach dem Gehalt an solchen Substanzen noch mehr Säure hinzutun. Aber die von Schoorl angegebene Methode der Säurehydrolyse ist in solcher Konzentration des Glukoseureids, wie es bei unserem Versuche im Harn ausgeschieden wurde, brauchbar genug, um den biologischen Vergleichswert zu bestimmen, obwohl der gefundene Wert etwas niedriger als der theoretische ist. Zur Kontrolle untersuchte ich ausserdem Gesamtstickstoff, präformiertes Ammoniak und Harnstoff im innerhalb 24 Stunden ausgeschiedenen Harn des Kaninchens und bestimmte daraus die Stickstoffrelikte, d.h. die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoffe und dem in den Formen von Ammoniak und Harnstoff vorhandenen Stickstoffe. Ich betrachtete im grossen und ganzen den Unterschied zwischen den Stickstoffrelikten am Injektionstage und an anderen Tagen als solchen Stickstoff, welcher durch die Gegenwart von Glukoseureid im Harn bedingt ist, und berechnete daraus indirekt die Menge von Glukoseureid. Selbstverständlich darf die auf diese Weise gefundene Zahl keinen Anspruch auf Exaktheit

machen. Ich gebrauchte jedoch die indirekte Messung zur Kontrolle der direkten Bestimmung, um Fehler bei der biologischen Betrachtung zu vermeiden.

Als Versuchstiere benutzte ich in allen Fällen gesunde Kaninchen, welche über 2 kg wogen. Alle Kaninchen wurden täglich mit 400 g Okara und 100 g Kohl, in 2 Mahlzeiten geteilt, gefüttert und im Stoffwechselkäfig gehalten. Der innerhalb 24 Stunden ausgeschiedene Harn wurde jeden Morgen gesammelt. Am Versuchstag wurden freier Blutzucker, (nach Hagedorn und Jensen, 1923) gebundener und gesamter Zucker (nach Iizuka, 1928) und Blutharnstoff (nach van Slyke und Cullen, 1922) zuerst im nüchternen Zustand bestimmt und dann eine gewisse Menge von Glukoseureid injiziert, um weiter mit halbstündigen Intervallen den Blutzucker und Blutharnstoff 3 Stunden (bisweilen 4 Stunden) lang zu untersuchen. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Kaninchen gefüttert. Sein Harn wurde am nächsten Morgen gesammelt und Ammoniak (nach van Slyke und Cullen, 1914) Harnstoff (nach van Slyke und Cullen's Ureäsemethode) und Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl's Methode)) bestimmt. Ausserdem wurde ein Teil des Harns nach Säurezusatz 10 Stunden gekocht und die Menge der gespaltenen Glukose und des Harnstoffs bestimmt, woraus die Menge des Glukoseureids berechnet wurde. Einige Tage vor und nach dem Versuchstage wurden Ammoniak, Harnstoff und Gesamtstickstoff im Harn des Kaninchens in gleicher Weise bestimmt.

I. VERHALTEN VON GLUKOSEUREID BEI NORMALEN KANINCHEN.

12 Kaninchen wurden untersucht.

Fall 1. Kaninchen Nr. 5. Wie die Tabelle I zeigt, wurden dem Kaninchen zum ersten Mal (am 13. X. 1928) 2.7 g von Glukoseureid (pro kg Körpergewicht 1 g) intraperitoneal injiziert und danach wurden der freie, gebundene und gesamte Blutzucker und

TABELLE I.
Kaninchen Nr. 5. ♂

Datum (1928)	13. X.	17. X.	22. X.	27. X.
Körpergew. (kg)	2,70	2,77	2,75	2,75
Injektion (intra-perit.)	Glukoseureid 2,7 g Aq. dest. 20 ccm	Glukose Harnstoff 0,67 g Aq. dest. 20 ccm	Glukose Harnstoff 0,45 g Aq. dest. 8 ccm	Glukoseureid 5,4 g Aq. dest. 20 ccm
Blut (mg%)	Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
	frei geb. ges.	frei geb. ges.	frei geb. ges.	frei geb. ges.
vor der Inj.	108 83 191	111 84 195	110 124 234	106 128 234
30 Min. nach d. Inj.	142 219 361	190 153 343	131 135 266	119 263 382
1 Stde. nach d. Inj.	166 212 378	205 187 54	131 139 290	116 316 432
1 Stde. 30 Min. nach d. Inj.	165	187	168	138
2 Stdn. nach d. Inj.	162 209 371	192 124 316	163 86 249	123
3 Stdn. nach d. Inj.	159	170	165	
Differenz	+58 +136 +187	+94 +69 +148 +26	+58 +15 +56 +8	+32 +188 +198 +10
Glukoseureid im Harn	2,11 g (78,2%)			3,73 g (69,1%)

die Menge des Glukoseureids, welche im Harn unverändert ausgeschieden wurde, ermittelt. Als zweiter Versuch (am 17. X. 1928) wurden 2.7 g Glukose und Harnstoff, im Mengenverhältnisse 3:1 gemischt, d.h. in dem Glukoseureid bildenden Verhältnisse, intraperitoneal injiziert; die drei Arten von Blutzucker und Harnstoff wurden bestimmt und mit den Resultaten des ersten Versuchs verglichen. Die Erhöhung des freien Blutzuckers betrug bei der ersten Injektion (Glukoseureid) 58 mg% (+53.7%), bei der zweiten Injektion (Glukose und Harnstoff) 94 mg% (+84.7%). Dagegen war die Zunahme des gebundenen Blutzuckers bei der ersten Darreichung 136 mg% (+164%) und bei der zweiten 69 mg% (+82%). Ausserdem schied das Kaninchen bei der ersten Injektion 2.11 g von Glukoseureid im Harn aus, aber bei der zweiten schied es den Zucker nicht aus. Aus diesem Resultate ist es klar, dass ein Teil des zugeführten Glukoseureids unverändert durch den Tierkörper passiert war. Deswegen wurden zum dritten Mal 0.6 g eines Gemisches von Glukose und Harnstoff in demselben Verhältnisse wie bei der zweiten Injektion dargereicht, da bei der ersten Injektion ca. 0.6 g Glukoseureid verwertet worden war. Diesmal war die Erhöhung des freien Zuckers 58 mg% (+52.7%), fast gleich der ersten Injektion. Endlich, zum vierten Mal, wurden dem Kaninchen 5.4 g von Glukoseureid (pro kg Körpergewicht 2 g) zugeführt und die Blut- und Harnuntersuchung ergab das Resultat, wie es die Tabelle I zeigt.

TABELLE II.
Kaninchen Nr. 6. ♀

Datum (1928)	31. X.	5. X.	9. X.																																																																																																									
Körpergew. (kg)	2.30	2.34	2.41																																																																																																									
Injektion (intraperit.)	Glukoseureid 2.3 g Aq. dest. 20 cem	Glukose Harnstoff Aq. dest. 20 cem	Glukoseureid 4.6 g Aq. dest. 20 cem																																																																																																									
Blut (mg%)	<table> <tr> <th colspan="3">Zucker</th><th rowspan="2">+ Ur</th></tr> <tr> <th>frei</th><th>geb.</th><th>ges.</th></tr> <tr> <td>134</td><td>115</td><td>249</td><td>34</td></tr> <tr> <td>174</td><td>203</td><td>377</td><td></td></tr> <tr> <td>187</td><td>218</td><td>405</td><td>42</td></tr> <tr> <td>182</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>181</td><td>196</td><td>377</td><td>40</td></tr> <tr> <td>180</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>+ 53</td><td>+ 103</td><td>+ 156</td><td>+ 8</td></tr> </table>	Zucker			+ Ur	frei	geb.	ges.	134	115	249	34	174	203	377		187	218	405	42	182				181	196	377	40	180				+ 53	+ 103	+ 156	+ 8	<table> <tr> <th colspan="3">Zucker</th><th rowspan="2">+ Ur</th></tr> <tr> <th>frei</th><th>geb.</th><th>ges.</th></tr> <tr> <td>109</td><td>161</td><td>270</td><td>40</td></tr> <tr> <td>192</td><td>170</td><td>362</td><td></td></tr> <tr> <td>205</td><td>181</td><td>386</td><td>68</td></tr> <tr> <td>217</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>191</td><td>185</td><td>376</td><td>62</td></tr> <tr> <td>168</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>+ 108</td><td>+ 24</td><td>+ 116</td><td>+ 28</td></tr> </table>	Zucker			+ Ur	frei	geb.	ges.	109	161	270	40	192	170	362		205	181	386	68	217				191	185	376	62	168				+ 108	+ 24	+ 116	+ 28	<table> <tr> <th colspan="3">Zucker</th><th rowspan="2">+ Ur</th></tr> <tr> <th>frei</th><th>geb.</th><th>ges.</th></tr> <tr> <td>117</td><td>169</td><td>286</td><td>40</td></tr> <tr> <td>125</td><td>268</td><td>393</td><td></td></tr> <tr> <td>120</td><td>333</td><td>453</td><td>50</td></tr> <tr> <td>117</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>131</td><td>305</td><td>436</td><td>48</td></tr> <tr> <td>125</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>+ 18</td><td>+ 164</td><td>+ 167</td><td>+ 10</td></tr> </table>	Zucker			+ Ur	frei	geb.	ges.	117	169	286	40	125	268	393		120	333	453	50	117				131	305	436	48	125				+ 18	+ 164	+ 167	+ 10
Zucker			+ Ur																																																																																																									
frei	geb.	ges.																																																																																																										
134	115	249	34																																																																																																									
174	203	377																																																																																																										
187	218	405	42																																																																																																									
182																																																																																																												
181	196	377	40																																																																																																									
180																																																																																																												
+ 53	+ 103	+ 156	+ 8																																																																																																									
Zucker			+ Ur																																																																																																									
frei	geb.	ges.																																																																																																										
109	161	270	40																																																																																																									
192	170	362																																																																																																										
205	181	386	68																																																																																																									
217																																																																																																												
191	185	376	62																																																																																																									
168																																																																																																												
+ 108	+ 24	+ 116	+ 28																																																																																																									
Zucker			+ Ur																																																																																																									
frei	geb.	ges.																																																																																																										
117	169	286	40																																																																																																									
125	268	393																																																																																																										
120	333	453	50																																																																																																									
117																																																																																																												
131	305	436	48																																																																																																									
125																																																																																																												
+ 18	+ 164	+ 167	+ 10																																																																																																									
vor der Inj. 30 Min. nach d. Inj. 1 Stde. nach d. Inj. 1 Stde. 30 Min. nach d. Inj. 2 Stdn. nach d. Inj. 3 Stdn. nach d. Inj. Differenz	1.33 g (58%)																																																																																																											
Glukoseureid im Harn	3.07 g (66.8%)																																																																																																											

TABELLE III.
Kaninchen Nr. 7. ♂

Datum (1928)	20. XI.	23. XI.	23. XI.
Körpergew. (kg)	2.00	2.00	1.97
Injektion (intraperit.)	Glukoseureid 2.0 g Aq. dest. 20 ccm	Glukose Harnstoff Aq. dest. 20 ccm	Glukoseureid 4.0 g Aq. dest. 20 ccm
Blut (mg%)			
	frei geb. ges. $\frac{+}{Ur}$	frei geb. ges. $\frac{+}{Ur}$	frei geb. ges. $\frac{+}{Ur}$
vor der Inj.	96 113 209 35	119 159 278 33	91 137 228 31
30 Min. nach d. Inj.	135 167 302	193 119 312	117 271 388
1 Stde. nach d. Inj.	156 191 327 35	146 142 288 56	103 319 422 34
1 Stde. 30 Min. nach d. Inj.	137	155	110
2 Stdn. nach d. Inj.	128 162 290 47	147 157 304 45	94 285 379 46
3 Stdn. nach d. Inj.	110	147	73
Differenz	+ 41 + 78 + 118 + 12	+ 74 - 2 + 34 + 23	+ 26 + 182 + 194 + 15
Glukoseureid im Harn	0.63 g (31.6%)		2.85 g (71.3%)

Fall 2. Kaninchen Nr. 6. und Fall 3. Kaninchen Nr. 7. Wie es aus den Tabellen II und III ersichtlich ist, wurden die Kaninchen mit Glukoseureid (pro kg Körpergewicht 1 g) intraperitoneal injiziert und die drei Arten des Blutzuckers und der Blutharnstoff bestimmt. Beim zweiten Versuch wurde ihnen das Gemisch von Glukose und Harnstoff (pro kg Körpergewicht 1 g) injiziert und darauf beide Resultate verglichen. Die Erhöhung des freien Blutzuckers war bei der zweiten Injektion (Glukose und Harnstoff) grösser, während der Anstieg des gebundenen Zuckers das entgegengesetzte Verhalten zeigte. Solche Erscheinungen beweisen, dass ein Teil des zugeführten Glukoseureids im Blut unverändert vorhanden ist, und stimmen mit dem Resultate des Harns überein.

Weiter untersuchte ich die Frage, ob die Veränderung des Blutzuckers und Blutharnstoffes und die Menge des ausgeschiedenen Glukoseureids im Harn bei demselben Kaninchen immer gleich ist, wenn die Injektionsdosis von Glukoseureid immer konstant ist. Wie die Tabelle IV zeigt, war der maximale Blutzuckerwert beim Kaninchen Nr. 2 248 mg% (+130 mg%) und 224 mg% (+98 mg%); beim Kaninchen Nr. 3 130 mg% (+39 mg%), 132 mg% (+31 mg%) und 130 mg% (+14 mg%). Was den Blutharnstoff betrifft, nahm er beim Kaninchen Nr. 2 zweimal 9 mg%, beim Kaninchen Nr. 3 2.12 und 11 mg% zu. Aus diesen Resultaten kann man ohne weiteres schliessen, dass die Veränderung des Blutzuckers und Blutharnstoffes bei demselben Kaninchen und bei gleicher Dosis von Glukoseureid fast immer gleich ist. Dagegen verhielt sich die Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids verschieden, so dass man dabei keine bestimmte Regel aufzufinden kann.

Zwischen der injizierten Menge von Glukoseureid und der Erhöhung des Blutzuckers und Blutharnstoffes bei demselben Kaninchen kann man auch keine bestimmte Beziehung finden. Wie man aus den Tabellen I–V ersieht, war der Anstieg des freien Blutzuckers beim Kaninchen Nr. 3 und 4 nach der Injektion der grösseren Menge von Glukoseureid etwas höher als nach der In-

TABELLE IV.

Nummer d. Kaninchens	Nr. 2. ♀				Nr. 3. ♂			
	17. IX.	20. IX.	23. IX.	4. X.	14. X.	19. X.	24. X.	7. XI.
Datum (1927)								
Körpergewicht (kg)	2,16	2,18	2,18	2,36	2,40	2,39	2,35	2,35
Injektion (intraperit.)	G.U. 2,67 g Aq. 10 cem	G.U. 2,67 g Aq. 10 cem	Glukose + 2,0 g Ur 0,67 g Aq. 10 cem	G.U. 3,29 g Aq. 10 cem	G.U. 3,29 g Aq. 10 cem	Aq. 10 cem G.U. 3,29 g	G.U. 6,58 g Aq. 20 cem	Glukose + 2,47 g Ur 0,82 g Aq. 10 cem
Blut (mg%)	F.Z. 118 Ur 33	F.Z. 126 Ur 35	F.Z. 101 Ur 34	F.Z. 91 Ur 32	F.Z. 101 Ur 32	F.Z. 116 Ur 34	F.Z. 94 Ur 31	F.Z. 90 Ur 36
vor der Injektion								
15 Min. nach Inj.	248	181	224	126	121	130	136	227
30 Min. nach Inj.		192	222	120	132	128	133	221
45 Min. nach Inj.	236	180	218	130	120	129	128	242
1 Stde. nach Inj.	248	183	208	113	122	123	118	206
1 Stde. 30 Min. nach Inj.	247	214	225	113	117	123	126	185
2 Stdn. nach Inj.	234	203	210	121	115	115	130	172
3 Stdn. nach Inj.	206	224	230	114	106	104	131	122
4 Stdn. nach Inj.				124	99	100	132	115
Differenz	+130 + 9	+ 98 + 9	+129 +30	+ 39 + 2	+ 31 +12	+14 +11	+ 42 +19	+152 +34
G.U. = Glukoseureid in Harn	1,77 g (66,3%)	0,46 g (16,6%)		0,75 g (22,8%)	1,50 g (45,6%)	2,18 g (66,3%)	3,76 g (57,1%)	

TABELLE V.

Nummer d. Kaninchens	Nr. 1. ♀			Nr. 4. ♀		
Datum	27. VI. 1927.	1. VII. 1927.		10. XI. 1927.	14. XI. 1927.	21. XI. 1927.
Körpergewicht (kg)	3,05	3,17		2,84	2,96	2,95
Injektion (intraperit)	Glukose 9 g Harnstoff 3 g Aq. 25 cem (intravenös)	G.U. 12 g Aq. 25 cem (intravenös)		Glukose 1,5 g Harnstoff 0,5 g Aq. 15 cem	G.U. 2 g Aq. 15 cem	G.U. 1 g Aq. 15 cem
Blut (mg%)	F.Z.	$\frac{+}{U_r}$	$\frac{+}{U_r}$	F.Z.	$\frac{+}{U_r}$	F.Z.
	120	36	36	100	32	84
vor der Injektion	705	117	78	127		125
15 Min. nach Inj.	553	119	68	137		115
30 Min. nach Inj.	467	102	74	147		113
45 Min. nach Inj.	364	84	54	145	35	110
1 Stde. nach Inj.	246	96	50	147		98
1 Stde. 30 Min. nach Inj.	174	86	50	137	35	96
2 Stdn. nach Inj.	121	82	44	142	42	97
3 Stdn. nach Inj.				123		91
4 Stdn. nach Inj.				+ 47	+ 10	+ 41
Differenz	+585	+144	+ 4	+ 42	+ 4	+10
Glukoseureid im Harn	Zucker 3,87 g		4,2 g (35%)	0,36 g (17,8%)		0,66 g (65,5%)

TABELLE V. (Fortsetzung)

Nummer d. Kaninchens	Nr. 8. ♂		Nr. 9. ♀		Nr. 10. ♀		Nr. 11. ♀	
	12. XII. 1928.		27. XII. 1928.		4. I. 1929.		12. I. 1929.	
Körpergewicht (kg)	1.83		2.26		2.61		2.34	
Injektion (intraperit.)	G.U. 3.5 g Aq. 20 ccm		G.U. 4.5 g Aq. 20 ccm		G.U. 5.2 g Aq. 20 ccm		G.U. 4.7 g Aq. 20 ccm	
Blut (mg%)	F.Z.	geb. Z.	F.Z.	geb. Z.	F.Z.	geb. Z.	F.Z.	geb. Z.
	114	72	128	208	97	195	68	125
vor der Injektion								
15 Min. nach Inj.								
30 Min. nach Inj.	146	156	181	403	149	529	80	308
45 Min. nach Inj.								
1 Stde. nach Inj.	125	169	180	359	165	496	140	242
1 Stde. 30 Min. nach Inj.	129		146		164		80	
2 Stdn. nach Inj.	127		125	384	164	416	67	229
3 Stdn. nach Inj.	114		114		194		43	
4 Stdn. nach Inj.								
Differenz	+32	+97	+53	+195	+97	+334	+72	+183
Glukoseureid im Harn	2.18 g (63.3%)		1.94 g (43.2%)		3.98 g (76.6%)		2.84 g (60.4%)	

jektion der kleineren Menge, aber beim Kaninchen Nr. 5, 6 und 7 war es umgekehrt. Dagegen war der Anstieg des gebundenen Zuckers desto höher, je grösser die injizierte Menge war. Die Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids war bei der grösseren Zufuhr des Glukoseureids grösser als bei der kleineren, mit der Ausnahme des einen Falls von Kaninchen Nr. 4. Aber das Mengenverhältnis zwischen zugeführtem und ausgeschiedenem Glukoseureid war verschieden, bald war es grösser bei kleinerer Zufuhr (Nr. 4 und 5), bald verhielt es sich umgekehrt (Nr. 3, 6 und 7).

Wie die Tabellen I–V und XII zeigen, wurden 12 Kaninchen im ganzen 20 mal mit Glukoseureid injiziert und danach schieden sie ausnahmslos einen Teil des Glukoseureids im Harn aus. Die Menge des ausgeschiedenen Glukoseureids betrug zwischen 60–70% des zugeführten und betrug maximal 82.1%, minimal 16.6% und durchschnittlich 54.36%.

TABELLE VI.
Kaninchen Nr. 2. ♀

Datum (1927)	Körper- gewicht (kg)	Harn- menge (ccm)	N, der als Ur u. NH ₃ im Harn vorhanden ist (g)	Gesamt- N im Harn (g)	N- Relikte (g)	+ Ur im Harn (g)	Injektion
14. IX.	2.14	385	1.810	1.867	0.057	3.784	
15. IX.	2.13	340	1.838	1.882	0.044	3.843	
16. IX.	2.15	360	1.583	1.644	0.061	3.154	
17. IX.	2.16	205	1.288	1.673	0.385	2.745	G.U. 2.67 g
18. IX.	2.13	330	1.846	1.935	0.089	3.920	
19. IX.	2.15	365	2.155	2.194	0.039	4.542	
20. IX.	2.18	200	1.258	1.427	0.169	2.669	G.U. 2.67 g
21. IX.	2.16	225	1.544	1.631	0.087	3.045	
22. IX.	2.14	380	1.842	1.927	0.085	3.871	
23. IX.	2.18	195	1.814	1.888	0.074	3.849	Glukose 2.0 g
24. IX.	2.16	210	1.700	1.786	0.086	3.586	+ Ur 0.67 g
25. IX.	2.16	225	1.234	1.302	0.068	2.622	

Was das Verhalten von Ammoniak, Harnstoff und Gesamtstickstoff im Harn betrifft, war das Stickstoffrelikt, d.h. die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und dem als Ammoniak und Harnstoff im Harn vorhandenen Stickstoff, am Tage der Glukoseureidinjektion im Vergleich zu anderen Tagen auffallend gross. Das Ergebnis weist darauf hin, dass ein Teil des zugeführten Glukoseureids unverändert im Harn vorhanden ist. Eine bestimmte Beziehung zwischen dem Harnstoffgehalt im Harn und der Darreichung des Glukoseureids war nicht nachweisbar.

Zusammenfassung der Versuche an normalen Kaninchen:

1. Bei der intraperitonealen Injektion der wässerigen Glukoseureidlösung steigen sowohl der gesamte als auch der gebundene und freie Blutzucker an und gelangen in $\frac{1}{2}$ – $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der Injektion bis zu einem gewissen Höhepunkt, um weiter allmählich bis zum Anfangswert abzusinken. Wenn man die Blutzuckererhöhung bei der Injektion von Glukoseureid und bei der Dar-

TABELLE VII.
Kaninchen Nr. 3. ♂

Datum (1927)	Körper- gewicht (kg)	Harn- menge (cem)	N, der als Ur u. NH_3 im Harn vorhanden ist (g)	Gesamt- N im Harn (g)	N- Relikte (g)	$\frac{+}{\text{Ur}}$ im Harn (g)	Injektion
13. X.	2.34	185	0.979	1.001	0.022	3.053	
14. X.	2.40	190	1.477	1.850	0.373	3.150	G.U. 3.29 g
15. X.	2.29	245	1.737	1.795	0.058	3.700	
18. X.	2.39	365	1.943	1.995	0.052	4.150	
19. X.	2.42	225	1.265	1.709	0.444	2.695	G.U. 3.29 g
20. X.	2.43	400	1.705	1.772	0.067	3.629	
21. X.	2.38	390	2.041	2.090	0.049	4.343	
23. X.	2.35	185	1.568	1.658	0.090	3.350	
24. X.	2.39	220	1.395	2.181	0.786	2.980	G.U. 6.58 g
25. X.	2.39	230	1.479	1.526	0.047	2.988	Glukose 2.47 g
7. XI.	2.35	365	1.918	2.056	0.138	4.095	$\frac{+}{\text{Ur}}$
8. XI.	2.36	330	1.345	1.484	0.139	2.863	0.82 g

TABELLE VIII.
Kaninchen Nr. 5. ♂

Datum (1928)	Körper- gewicht (kg)	Harn- menge (ccm)	N, der als Ur u. NH ₃ im Harn vorhanden ist (g)	Gesamt- N im Harn (g)	N- Relikte (g)	⁺ Ur im Harn (g)	Injektion
11. X.	2.57	360	1.369	1.637	0.268	2.920	
12. X.	2.72	290	0.940	1.171	0.231	2.005	
13. X.	2.70	300	1.378	1.886	0.508	2.941	G.U. 2.7 g
14. X.	2.66	355	1.014	1.206	0.192	2.162	
17. X.	2.77	255	1.759	1.887	0.128	3.764	Glukose 2.1 g Harnstoff
18. X.	2.65	220	0.821	0.915	0.094	1.750	0.67 g
22. X.	2.75	265	1.580	1.754	0.174	3.377	Glukose 0.45 g Harnstoff
23. X.	2.67	170	0.895	0.945	0.050	1.907	0.15 g
27. X.	2.75	235	1.210	1.940	0.730	2.583	G.U. 5.4 g
28. X.	2.73	220	1.140	1.195	0.055	2.439	

reichung der entsprechenden Menge des Gemisches von Glukose und Harnstoff vergleicht, so ist der Anstieg des gebundenen Blutzuckers bei der vorigen höher als bei der letzteren, während der freie Blutzucker sich umgekehrt verhält.

2. Der Blutharnstoff nimmt nach der Injektion von Glukoseureid meistens zu; doch ist seine Erhöhung nach der Injektion des Gemisches von Glukose und Harnstoff in entsprechender Menge noch etwas grösser.

3. Die Veränderungen des Blutzuckers und Blutharnstoffes nach der Injektion der gleichen Menge von Glukoseureid zeigten bei demselben Kaninchen in allen Fällen keinen bedeutenden Unterschied; jedoch ist die im Harn ausgeschiedene Menge des Glukoseureids verschieden. Der Anstieg des gebundenen Blutzuckers ist desto höher, je grösser die Injektionsdosis ist. Für die Beziehung zwischen der injizierten Menge von Glukoseureid, der Erhöhung des freien Blutzuckers und Blutharnstoffes und der Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids kann man aber keine bestimmte Regel finden.

4. Nach der Injektion des Glukoseureids wird ein Teil desselben unverändert im Harn ausgeschieden. Obwohl die ausgeschiedene Menge verschieden ist, beträgt sie am häufigsten 60–70% der zugeführten Menge; maximal 82.1%, minimal 16.6%, durchschnittlich 54.36%.

5. Die Stickstoffrelikte, d.h. die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und dem in den Formen von Ammoniak und Harnstoff im Harn vorhandenen Stickstoff, ist am Tage der Glukoseureidinjektion auffallend grösser als an anderen Tagen.

II. VERHALTEN DES GLUKOSEUREIDS BEI INSULIN-HYPOGLYKÄMISCHEN KANINCHEN.

Fall 1. Kaninchen Nr. 6. Nach 24 stündigem Hungern wurde der Blutzucker untersucht und dann 0.7 cem von Insulin Toronto (7 klin. Einheiten) subcutan eingespritzt, Zwei Stunden nach der Insulininjektion wurde der Blutzucker wieder untersucht und 2.3 g von Glukoseureid (pro kg Körpergewicht 1 g) intraperitoneal injiziert, um dann den Blutzucker weiter in einem halbstündigen

TABELLE IX.

Kaninchen Nr. 6. ♀ Körpergewicht 2.28 kg

7. XII. 1928.		Blutzucker mg%			Bemerkungen.
		frei	geb.	ges.	
9.20' a.m.	vor der Injekt.	110	109	219	9.37' Insulin 0.7 cem subcutan inj. 11.40' Glukoseureid 2.3 g intraperit.
11.37' „	2 Stdn. n.d. Insulin-Inj.	37	95	132	
12.10' p.m.	30' n.d. G.U. Inj.	35	165	200	
12.40' „		29	186	215	
1.10' „		28			
1.40' „		29	207	236	Krämpfe 2.00 p.m.†
Differenz		-82	-14 +98	-87 +17	

Intervall zu bestimmen. Wie die Tabelle IX zeigt, nahmen die drei Arten des Blutzuckers nach der Insulininjektion ab, der gebundene Zucker nahm nach der Glukoseureidinjektion wieder zu und erreichte den maximalen Wert 207 mg% (+98 mg%), welcher mit dem bei einfacher Glukoseureidinjektion 218 mg% (+103 mg%) fast gleich war (Siehe Tabelle II). Dagegen nahm der freie Blutzucker nicht zu, sondern stets ab. Schliesslich traten Krämpfe ein und das Tier starb 4 Stunden 20 Minuten nach der Insulininjektion. Nach dem Tode wurden 6 ccm Harn aus der Harnblase entnommen, worin 0.44 g Glukoseureid nachgewiesen wurde.

Fall 2. Kaninchen Nr. 7. Die Versuchsanordnung ist ganz dieselbe wie beim vorigen Fall. Wie die Tabelle X zeigt, wurde

TABELLE X.
Kaninchen Nr. 7. ♂ Körpergewicht 1.67 kg

17. XII. 1928.		Blutzucker mg%			Bemerkungen.
		frei	geb.	ges.	
9.40' a.m.	vor der Inj.	104	132	236	9.45' Insulin 0.75 ccm subcutan inj.
11.30' „	1.45' n.d. Insulin inj.	39	107	146	11.30' Glukoseureid 4 g intraperit.
12.05' p.m.	30' n.d. G.U. Inj.	27	220	247	
12.35' „		19	297	316	Krämpfe 12.45' p.m.†
Differenz		-85	- 25 +165	-90 +80	

dem Kaninchen 0.75 ccm von Insulin Toronto (7.5 klin Einheiten) subcutan injiziert und 1¾ Stunde nach der Insulininjektion, nach der abermaligen Untersuchung des Blutzuckers, 4 g Glukoseureid intraperitoneal zugeführt, um weiter den Blutzucker zu untersuchen. Der durch die Insulininjektion einmal abgesunkene gebundene Blutzucker nahm nach der Zufuhr von Glukoseureid wieder zu und gelangte zum maximalen Wert 297 mg% (+165 mg%), welcher mit dem bei einfacher Glukoseureidinjek-

tion, 219 mg% (+182 mg%), fast übereinstimmt (Siehe Tabelle III). Dagegen nahm der freie Zucker immer ab, und das Kaninchen starb nach wiederholten Krämpfen 3 Stunden nach der Insulininjektion. Nach dem Tode bekam ich 27 ccm Harn aus der Harnblase, welcher 0.35 g Glukoseureid enthielt.

Fall 3. Kaninchen Nr. 8. Wie die Tabelle XI zeigt, wurde dem Kaninchen im Gegensatz zu den vorigen zwei Fällen zuerst Glukoseureid und nach einem halbstündigen Ablauf 0.7 ccm Insulin Toronto (7 klin. Einheiten) injiziert, um weiter in einem

TABELLE XI.
Kaninchen Nr. 8. ♂ Körpergewicht 1.78 kg

23. XII. 1928.		Blutzucker mg%			Bemerkungen.
		frei	geb.	ges.	
9.00' a.m.	vor d. Inj.	97	211	308	9.10' Glukoseureid 3.5 g intraperit. 9.45' insulin 0.7 ccm subcutan inj.
9.40' „	30' n.d. G.U. Inj.	119	381	500	
10.15' „	30' n.d. Insulin inj.	99			
10.45' „		61	289	350	
11.15' „		39			
11.45' „		25	277	302	
12.15' p.m.		22			Krämpfe.
12.45' „		28	162	190	
1.15' „		35			
1.45' „		38			
Differenz		+22 -75	+170 - 40	+192 - 118	

halbstündigen Intervall den Blutzucker zu untersuchen. Nachdem die drei Arten von Blutzucker durch die Zufuhr von Glukoseureid einmal angestiegen waren, nahmen sie nach der Insulininjektion

stets ab und gelangten bis unter den Anfangswert; besonders war die Herabsetzung des freien Blutzuckers auffallend. Das Kaninchen starb nach mehrmaligen Krämpfen 5 Stunden nach der Insulininjektion. Aus seiner Harnblase bekam ich 36 ccm Harn, darin wurde 0.9 g Glukoseureid nachgewiesen.

Während bei den vorstehenden drei Kaninchen der Behandlung ein 24 stündiges Hungern voranging, wurden die nächsten zwei Fälle ohne solche Vorbereitung untersucht. *Fall 4. Kaninchen Nr. 5.* Zuerst wurden 0.8 ccm Insulin Tronto, dann 5.4 g Glukoseureid zugeführt. Der freie Blutzucker nahm ohne Einfluss der Glukoseureidinjektion vom Anfangswert 114 mg% immer ab und kam bis zu 26 mg%. Der gebundene Zucker nahm durch die Insulininjektion ein wenig vom Anfangswert 110 mg% ab und dann durch die Zufuhr vom Glukoseureid bedeutend zu; 1 Stunde nach der letzten Injektion konnte er die Zahl 386 mg% (+276 mg%) aufweisen. Der Gesamtzucker verhielt sich ganz ähnlich wie der gebundene Zucker; sein Anfangswert betrug 224 mg%, nach der Insulininjektion 145 mg% und eine Stunde nach der Darreichung von Glukoseureid 422 mg% (+198 mg%). Wenn man die Resultate bei diesem Versuche und bei einfacher Zufuhr von Glukoseureid vergleicht (Siehe Tabelle I), so war der Anstieg der gebundenen Zuckers bei diesem Versuche höher, dagegen das Verhalten des freien Zuckers umgekehrt.

Fall 5. Kaninchen Nr. 9. Zuerst wurden 4.5 g Glukoseureid, dann 0.7 ccm Insulin Toronto injiziert. Der freie Blutzucker stieg durch die Zufuhr von Glukoseureid vom Anfangswert 128 mg% zu 192 mg% an, sank dann infolge der Insulininjektion wieder ab und betrug 4 Stunden nach der letzten Injektion 15 mg%. Der gebundene Blutzucker nahm durch die Glukoseureidinjektion vom Anfangswert 174 mg% bis 334 mg% (+160 mg%) zu, aber durch die Insulininjektion nicht ab. Der Gesamtzucker stieg von 302 mg% zu 421 mg% (+119 mg%) an und sank dann allmählich ab. Zwischen dem Verhalten des gebundenen Blutzuckers bei diesem Versuche und dem bei einfacher Injektion von Glukoseureid

war kein bedeutender Unterschied vorhanden (Siehe Tabelle V). In beiden Fällen traten wiederholte Krämpfe ein, welche ohne Behandlung verschwanden. Die Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids betrug bei Kaninchen Nr. 5 3.08 g (57%) und bei Kaninchen Nr. 9 3.75 g (83.3%).

In diesen 5 Fällen war ausnahmslos ein Teil des injizierten Glukoseureids im Harn nachweisbar, obwohl 3 Kaninchen davon an Insulinhypoglykämie gestorben waren. Daraus ist es klar, dass ein Teil des injizierten Glukoseureids auch selbst bei der Insulinhypoglykämie unverändert durch den Tierkörper passiert war. Wenn man das Verhalten von Glukoseureid bei normalen und insulinhypoglykämischen Kaninchen vergleicht, so kann man erkennen, dass kein bedeutender Unterschied zwischen beiden Fällen vorhanden ist, da die Erhöhung des gebundenen Blutzuckers durch die Zufuhr von Glukoseureid in beiden Fällen fast gleich ist und auch das Mengenverhältnis zwischen zugeführtem und ausgeschiedenem Glukoseureid im Harn in beiden Fällen nicht voneinander abweicht.

Zusammenfassung der Versuche an insulinhypoglykämischen Kaninchen:

1. Die Injektion von Glukoseureid wirkt auf die durch die Insulinzufuhr hervorgerufene Abnahme des freien Zuckers nicht ein. Dagegen wirkt sie auf den gebundenen Zucker; er nimmt zu und erreicht dieselbe Höhe wie bei normalen Kaninchen.

2. Ausnahmslos wird ein Teil des injizierten Glukoseureids auch bei insulinhypoglykämischen Kaninchen unverändert im Harn ausgeschieden.

3. Glukoseureid verhält sich bei den insulinvergifteten Kaninchen ganz ähnlich wie bei den normalen.

III. VERHALTEN VON GLUKOSEUREID BEI HUNGERNDEN KANINCHEN.

4 Kaninchen wurden untersucht. Die Versuchskaninchen wurden im Stoffwechselkäfig gehalten und ihnen kein Futter

gegeben. Als die Körpergewichtsabnahme bis zu 20% des Anfangswertes gefallen war, wurde die wässrige Lösung von Glukoseureid intraperitoneal eingespritzt. Die Versuchsanordnung blieb dieselbe, wie sie an normalen Kaninchen ausgeführt wurde. In 2 Fällen konnte ich die 3 Arten des Blutzuckers, aber in den anderen 2 Fällen infolge der Inanitionsschwäche nur den freien Zucker untersuchen.

TABELLE XII.
Kaninchen Nr. 15. ♀

Datum (1929)	12. III.			18. III.		
Körpergewicht (kg)	2.29			1.72		
Körpergewichts- abnahme (kg)				0.55 (24.4%)		
Dauer des Fastens				5 Tage		
Injektion (intraperitoneal)	Glukoseureid 2.3 g Aq. dest. 20 ccm			Glukoseureid 2.3 g Aq. dest. 20 ccm		
Blutzucker (mg%)	frei	geb.	ges.	frei	geb.	ges.
vor der Inj.	77	166	243	89	133	224
30 Min. nach d. Inj.	83	373	456	87	242	329
1 Stde. nach d. Inj.	80	287	367	83	311	394
1.30' Stdn. n.d. Inj.	90			88		
2 Stdn. nach d. Inj.	72	322	394	83		
3 Stdn. nach d. Inj.	77					
Differenz	+13	+197	+213	- 1	+178	+170
Glukoseureid im Harn	1.89 g (82.1%)			1.09 g (47.5%)		

Fall 1. Kaninchen Nr. 15. Wie die Tabelle XII zeigt, wurde

das Kaninchen in seinem normalen Zustande mit 2.3 g Glukoseureid (pro kg Körpergewicht 1 g) intraperitoneal injiziert und darauf sein Blutzucker und Harn untersucht. Dann wurde das Kaninchen volle 5 Tage dem Hunger ausgesetzt; in dieser Zwischenzeit nahm sein Körpergewicht vom Anfangswert 2.27 kg (am 13. III. 1929) zu 1.72 kg (24.4% Abnahme) ab. Dann bekam das hungernde Kaninchen wieder eine Injektion von Glukoseureid in derselben Menge, um beide Resultate zu vergleichen. Der freie Zucker nahm durch die Zufuhr von Glukoseureid beim Hungern

TABELLE XIII.

Kaninchen	Nr. 13. ♀	Nr. 14. ♀			Nr. 9. ♀
Dauer des Fastens	7 Tage	6 Tage			5 Tage
Körpergewicht (kg)	2.53	2.69			2.10
Beginn des Fastens					
Abnahme	2.04	2.16			1.50
Ende des Fastens	0.49 (19.4%)	0.53 (19.9%)			0.60 (28.6%)
Datum der Injektion	26. I. 1929.	7. II. 1929.			15. II. 1929.
Injektion (intraperitoneal)	G.U. 5.2 g Aq. 20 ccm	G.U. 2.7 g Aq. 20 ccm			G.U. 4.5 g Aq. 20 ccm
Blutzucker (mg%)	frei	frei	geb.	ges.	frei
vor der Injektion	101	102	147	249	60
30 Min. nach d. Inj.	88	112			62
1 Stde. nach d. Inj.	85	124	338	462	64
1.30' Stdn. n.d. Inj.	88	127			48
2 Stdn. nach d. Inj.	82	119	313	432	38
3 Stdn. nach d. Inj.	91	139			39
Differenz	-19	+ 37	+191	183	+ 4 -21
Glukoseureid im Harn	2.10 g (40.4%)	1.44 g (53.4%)			0.70 g (15.5%)

nicht zu; aber sein maximaler Wert war in beiden Fällen fast gleich. Die Zunahme des gebundenen Zuckers war 197 mg% und 178 mg%; was nicht genügt, um einen bedeutenden Unterschied festzustellen. Das im Harn ausgeschiedene Glukoseureid war 1.89 g (82.1%) und 1.09 g (47.5%).

Fall 2. Kaninchen Nr. 13. Fall 3. Kaninchen Nr. 14 Fall 4. Kaninchen Nr. 9. Wie aus der Tabelle XIII ersichtlich ist, nahm der freie Blutzucker bei Kaninchen Nr. 13 und 9, welche in hochgradige Inanition gefallen waren, nach der Glukoseureidinjektion nicht zu, sondern ab. Bei Kaninchen Nr. 14 war die Zunahme des freien Zuckers 37 mg% (+36%), die des gebundenen dagegen auffallend stark. Ein Teil des injizierten Glukoseureids wurde ausnahmslos im Harn unverändert ausgeschieden. Kaninchen Nr. 9 starb 9 Stunden nach der Injektion an Inanitionsschwäche, und aus seiner Harnblase wurde 30 ccm Harn erhalten, welcher 0.70 g Glukoseureid (15.5%) enthielt.

Wie oben erwähnt, fehlte bei 3 Fällen der Anstieg des freien Zuckers nach der Injektion. Aus dem Harnbefunde möchte ich die Ergebnisse so erklären, dass die Erhöhung des Blutzuckers wegen der Inanition nicht zustande kam, trotzdem die Kaninchen wohl einen Teil des zugeführten Glukoseureids abzubauen vermochten. Obwohl die Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids bei Kaninchen Nr. 15 nach dem Fasten geringer als in normalem Zustande war, darf man daraus nicht ohne weiteres schliessen, dass das hungernde Kaninchen das Glukoseureid mehr als im normalen Zustande verwertete; denn es ergab sich an normalen Kaninchen, dass die im Harn ausgeschiedene Menge des Glukoseureids bei demselben Kaninchen und der gleichen Dosis von Glukoseureid jedesmal etwas verschieden ist. Mit der Ausnahme des gestorbenen Kaninchens Nr. 9 war die durchschnittliche Menge des ausgeschiedenen Glukoseureids 47.12% des zugeführten, und wich von der durchschnittlichen Menge im normalen Zustande, 54.36%, nicht bedeutend ab. Ausserdem war die Zunahme des gebundenen Blutzuckers nach der Injektion von Glukoseureid bei

Kaninchen Nr. 15 in beiden Fällen fast gleich. Daher kann man schliessen, dass das Verhalten des Glukoseureids bei hungernden Kaninchen von dem bei normalen nicht sehr bedeutend abweicht, obwohl die Menge des im Harn ausgeschiedenen Glukoseureids bei hungernden Kaninchen meistens etwas geringer als die bei normalen ist.

Zusammenfassung der Versuche an hungernden Kaninchen:

1. Nach der Zufuhr von Glukoseureid nimmt der freie Blutzucker zu oder bleibt unbeeinflusst. Dagegen nimmt der gebundene Zucker immer bedeutend zu und seine Zunahme ist mit der im normalen Zustand fast gleich.

2. Nach der Injektion von Glukoseureid wird ein Teil desselben ausnahmslos im Harn unverändert ausgeschieden. Das Mengenverhältnis zwischen dem zugeführten und ausgeschiedenen Glukoseureid weicht von dem bei normalen Kaninchen nicht bedeutend ab.

3. Zwischen dem Verhalten des Glukoseureids bei hungernden und normalen Kaninchen kann man keinen sehr auffallenden Unterschied finden.

LITERATUR.

- Bang, J. (1913): Der Blutzucker. S. 56.
Fischer, E. (1914): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **47**, 1377.
Hagedorn, H. C. und Jensen, B. N. (1923): Biochem. Zeitschr. **135**, 46.
Helfferich, B. und Kosche, W. (1926): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **59**, 69.
Iizuka, N. (1928): Nihon-Naika-Gakkwai-Zasshi., **15**, 825.
Mayer, P. (1909): Biochem. Zeitschr., **17**, 145.
Pavy, Kumagawa und Suto (1904): Salkowski-Festschrift., 211.
Schoorl, M. N. (1903): Rec. d. trav. chim. d. Pay-Bas., **22**, 31.
Staub, H. (1927): Erg. d. inn. Med. u. Kinderheilk., **31**, 121.
van Slyke and Cullen (1913): Journ. of biol. chem., **15**, 495.
van Slyke and Cullen (1914): ibidem., **19**, 218.
van Slyke and Cullen (1922): ibidem., **51**, 33.

ÜBER DIE BUFODESOXYCHOLSÄURE (III).

VON

TAKEJI OKAMURA.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 20. Juni 1929.)

In der zweiten Mitteilung (1928) habe ich schon berichtet, dass die α -Dehydrobufodesoxycholsäure durch kurzes Erwärmen mit Eissessig und Salzsäure leicht in die neue isomere β -Dehydrobufodesoxycholsäure umgelagert wird. Weiter habe ich dann durch die Clemmensen'sche Reduktion eine neue Bufocholansäure aus α -Diketosäure gewonnen. Dabei habe ich bemerkt, dass die α -Diketosäure durch Reduktion rasch in die β -Diketosäure umgelagert und dadurch die neue Bufocholansäure gewonnen werden könnte. Unter der Clemmensen'schen Reduktion wurde wirklich die Bufocholansäure aus β -Diketosäure in prismatischen Nadeln erhalten. Diese aus β -Diketosäure erhaltene Bufocholansäure stimmt gut mit der aus α -Diketosäure gewonnenen überein, und zwar schmelzen beide bei $236^{\circ}\text{C}.$; der Mischschmelzpunkt der beiden Cholansäuren aus α - und β -Diketosäure liegt auch bei $236^{\circ}\text{C}.$ Der Bufocholansäureäthylester aus β -Diketosäure stimmt auch gut mit dem aus α -Diketosäure erhaltenen überein und beide Estern schmelzen bei $1008^{\circ}\text{--}111^{\circ}\text{C}.$ Der Mischschmelzpunkt des Bufocholansäureäthylesters aus β -Diketosäure mit dem aus α -Diketosäure liegt auch bei $108^{\circ}\text{--}111^{\circ}\text{C}.$ Nach diesen Ergebnissen ist sicher bewiesen, dass die α -Dehydrobufodesoxycholsäure durch die Clemmensen'sche Reduktion unter Umlagerung in die β -Dehydrobufodesoxycholsäure verwandelt wird und zwar dass die Bufo-

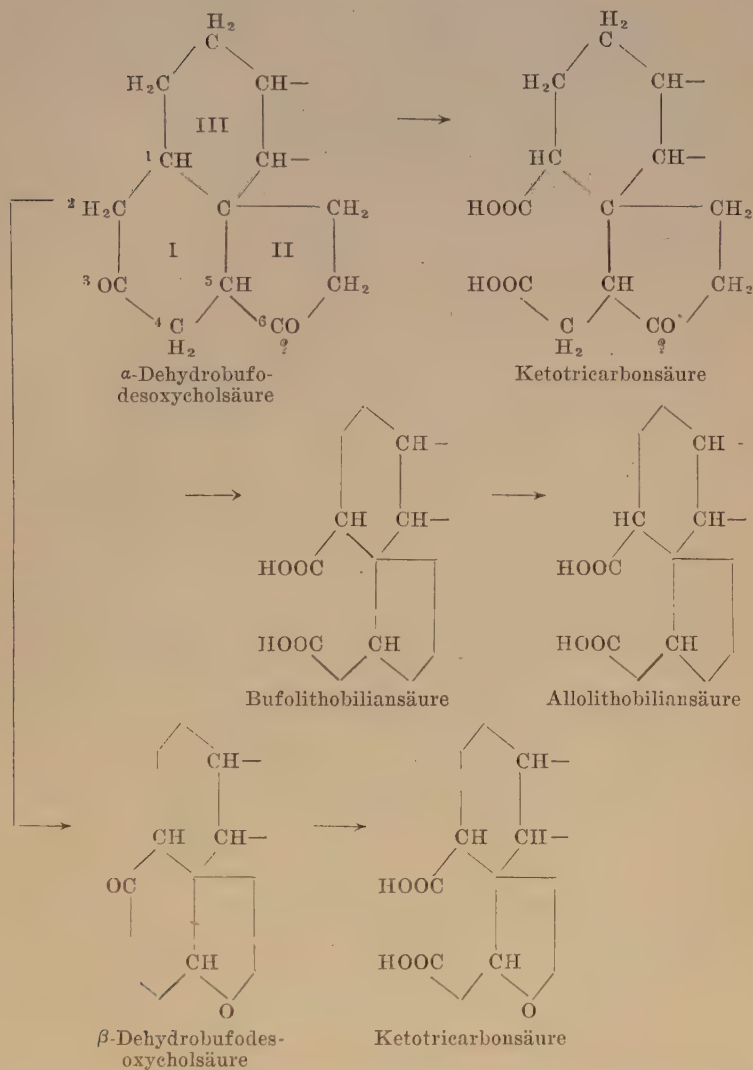
cholansäure nicht nur aus α -Dehydrobufodesoxycholsäure sondern auch aus β -Dehydrobufodesoxycholsäure gebildet wird.

Während die α -Diketosäure durch kurzes Erwärmen in saurer Lösung oder durch Reduktion in die β -Diketosäure verwandelt wird, lässt sie sich jedoch in alkalischer Lösung, z. B. bei 2 Wochen langem Stehen in 5%iger Kaliumhydroxydlösung oder noch bei 5 Stunden langem Erwärmen in derselben Lösung, unverändert umkristallisieren.

Die Ketotrikarbonsäure aus α -Diketosäure liefert bei der Clemmensen'schen Reduktion eine neue Bufolithobiliansäure von der Formel $C_{24}H_{38}O_6$, die bei 161° – 162° C. unter Erweichung bei 148° C. schmilzt; ihr Triäthylester kristallisiert in schönen Nadeln und schmilzt bei 133° – 134° C. unter Erweichung bei 117° C. Aus diesem Bufolithobiliansäuretriäthylester wurde durch Erwärmen in alkalischer Lösung eine neue Lithobiliansäure erhalten, die bei 210° – 211° C. schmilzt. Diese Säure hat denselben Schmelzpunkt wie die von Windaus (1926) aus Hyodesoxycholsäure abgeleitete Allolithobiliansäure. Aus diesen Daten scheint mir, dass eine sekundäre Alkoholgruppe der Bufodesoxycholsäure in der Stellung 3 des ersten Ringes vorhanden ist, wenn die hier erhaltene Lithobiliansäure mit der Windausschen Allolithobiliansäure identisch wäre. Aus α -Diketosäure werden 2 verschiedene Ketotricarbonsäuren gebildet, während aus β -Diketosäure nur eine Art von Ketotricarbonsäure geliefert wird. Auf Grund meines Versuches, besonders auf Grund des Überganges der Bufolithobiliansäure aus α -Diketosäure in die Allolithobiliansäure von Windaus nehme ich also an, dass die sterische Verschiedenheit zwischen α - und β -Diketosäure nur auf einer anderen sterischen Anordnung der Gruppe am C_1 beruht, als sie Windaus bei Hyodesoxycholsäure beobachtet hat.

Es scheint mir wahrscheinlich, dass die α -Diketosäure die Cis-, die β -Diketosäure die Trans-anordnung enthält, wie es in der folgenden Formelübersicht angegeben ist.

Bei der Oxydation der β -Dehydrobufodesoxycholsäure mit



Kaliumhypobromit wird eine Ketotricarbonsäure gebildet, die bei $177^\circ\text{--}179^\circ\text{C.}$ unter Aufschäumen schmilzt, während die α -Dehydrobufodesoxycholsäure dabei eine andere Ketotricarbon-

säure liefert, die bei 217°–218°C. schmilzt. Daher sind die aus den beiden α - und β -Diketosäuren bereiteten Ketotricarbonsäuren von der Formel $C_{24}H_{36}O_7$ verschieden.

Hier möchte ich bemerken, dass das Taurin aus dem von Bufodesoxycholsäure und Cholsäure befreiten Filtrate isoliert worden ist. Infolgedessen scheint es mir möglich, dass die Bufodesoxycholsäure, wenigstens die Cholsäure in der Galle von *Bufo vulgaris* gepaart mit Taurin vorkommt.

Experimenteller Teil.

VERHALTEN DER α -DIKETOSÄURE GEGEN ALKALI.

0,5 g α -Dehydrobufodesoxycholsäure wurde in 5%iger Kaliumhydroxydlösung gelöst, 2 Wochen lang stehen gelassen oder auf dem Wasserbade noch 5 Stunden lang erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure angesäuert und von dem ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde aus verdünntem Alkohol umbristallisiert; die in Nadeln kristallisierende Substanz schmilzt bei 230°C. Der Mischschmelzpunkt der hier erhaltenen Säure mit α -Diketosäure liegt auch bei 230°C. Daher ist die α -Dehydrobufodesoxycholsäure gegen Alkali beständig und wird unverändert umkristallisiert, während die α -Dehydrochodesoxycholsäure in alkalischer Lösung von N/5 KOH in die β -Diketosäure umgelagert wird.

β -DEHYDROBUFODESOXYCHOLSÄURE.

Die β -Säure ist in der zweiten Mitteilung beschrieben worden; die spezifische Drehung ist folgende:

0.2 g Substanz in 25 ccm von 9%igem Alkohol

$$[\alpha]_D^{29.5^\circ} = \frac{-0.09 \times 100}{1 \times 0.8} = -11.25$$

BUFOCHOLANSÄURE AUS β -DIKETOSÄURE.

Die essigsäure Lösung der β -Dehydrobufodesoxycholsäure

(1 g:50 cem) wurde auf 10 g amalgamiertes Zink gegossen, bis zu lebhaftem Sieden erhitzt und allmählich mit einem Gemisch von 50 cem konzentrierter Salzsäure und 25 cem Eisessig versetzt. Das über Nacht stehengelassene Reaktionsgemisch wurde vorsichtig bis zur Trübung mit Wasser versetzt und wiederum über Nacht stehen gelassen.

Dann scheidet sich die Bufocholansäure in prismatischen Nadeln ab, die mehrmals aus verdünntem Eisessig umkristallisiert wurden. Die Ausbeute beträgt ca. 60% des Ausgangsmaterials.

Der Kristall schmilzt bei 236°C. genau wie die Cholansäure aus α -Diketosäure. Der Mischschmelzpunkt mit Bufocholansäure aus α -Diketosäure ist 236°C.

Analyse.

0.099 g Substanz gaben 0.2893 g CO₂ und 0.1018 g H₂O.

C₂₄H₄₀O₂ Ber. C. 79.93% H. 11.19%

Gef. C. 79.6 „ H. 11.50 „

BUFOCHOLANSÄURE-ÄTHYLESTER AUS β -DIKETOSÄURE.

Der Ester wurde durch Einleiten von Salzsäuregas in die alkoholische Lösung der Bufocholansäure aus β -Diketosäure erhalten. Der Ester wird aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und kristallisiert in Nadeln. Der Schmelzpunkt ist 108°–111°C.; der Mischschmelzpunkt mit Bufocholansäureäthylester aus α -Diketosäure liegt bei 108°–111°C..

Dadurch erhält man dieselbe Bufocholansäure aus α - und β -Diketosäure und es ist sicher bewiesen, dass die α -Dehydrobufodesoxycholsäure durch die Clemmensen'sche Reduktion unter Umlagerung in die β -Diketosäure verwandelt wird.

BUFOLITHOBIANSÄURE AUS α -DIKETOSÄURE.

2 g Ketotricarbonsäure aus α -Diketosäure werden in 100 cem Eisessig gelöst und der Clemmensen'schen Reduktion unterworfen. Aus dem Reaktionsgemisch wurde eine in Nadeln kristal-

lisierende Substanz erhalten und aus verdünntem Eisessig mehrmals umkristallisiert. Sie schmilzt bei 161°–162°C.

Titration.

0.04 g Substanz brauchten 2.9 ccm N/10 NaOH

Äquivalent für $C_{24}H_{38}O_6$

Ber. 140.

Gef. 137.

Analyse.

0.1327 g Substanz gaben 0.3302 g CO_2 und 0.1125 g H_2O .

$C_{24}H_{38}O_6$ Ber. C. 68.20% H. 9.07%

Gef. C. 67.86 „ H. 9.48 „

BUFOLITHOBILIANSÄURETRIÄTHYLESTER.

In der üblichen Weise wurde der Ester durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas in die alkoholische Lösung der Bufolithobiliansäure hergestellt. Die Ausbeute beträgt Ca. 70% des Ausgangsmaterials.

Der aus verdünntem Äthylalkohol umkristallisierte Ester schmilzt bei 133°–134°C.

0.108 g Substanz gaben 0.2802 g CO_2 und 0.0994 g H_2O .

$C_{30}H_{50}O_6$ Ber. C. 71.09% H. 9.95%

Gef. C. 70.75 „ H. 10.29 „

ALLOLITHOBILIANSÄURE AUS BUFOLITHOBILIANSÄURE-TRIÄTHYLESTER.

0.5 g Bufolithobiliansäuretriäthylester wurden in 60 ccm einer 5%igen Natronlauge gelöst und auf dem Wasserbade ca. 30 Minuten lang erwärmt; dann färbt sich das Reaktionsgemisch grün. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit verdünnter Salzsäure angesäuert und filtriert. Der abfiltrierte Niederschlag wurde aus verdünntem Alkohol mehrmals umkristallisiert. Dann erhält man eine in Nadeln kristallisierende Substanz, die bei 211°–212°C.

schmilzt. Ausbeute Ca. 70%. Leider hat sie zur Analyse nicht ansgereicht.

KETOTRIKARBONSÄURE AUS β -DIKETOSÄURE.

Die Säure wurde nach der üblichen Methode mit Kaliumhypobromitlauge hergestellt, genau wie die Säure aus α -Diketosäure. Die aus verdünnter Essigsäure umkristallisierte Säure kristallisiert in schönen Nadeln und schmilzt bei 177°–179°C. unter Aufschäumen.

Titration.

0.04 g Substanz brauchten 2.8 ccm N/10 NaOH.

Äquivalent für $C_{24}H_{36}O_7$.

Ber. 145.

Gef. 143.

Analyse.

0.1225 g Substanz gaben 0.2951 g CO_2 und 0.0939 g H_2O .

$C_{24}H_{36}O_7$ Ber. C. 66.01% H. 8.31%

Gef. C. 65.7 „ H. 8.58 „

Die Ketotricarbonsäure aus β -Diketosäure schmilzt bei 177°–179°C. die Ketotricarbonsäure aus α -Diketosäure dagegen bei 217°–218°C. Daher sind die beiden Ketotricarbonsäuren aus α - und β -Diketosäure verschieden.

ANHANG.

Das von Cholsäure und Bufodesoxycholsäure befreite Filtrat der Krötengalle wurde mit NaOH neutralisiert, auf dem Wasserbade stark eingengt und von dem ausgeschiedenen Kochsalz abfiltriert. Das Filtrat wurde unter starkem Verdampfen möglichst von dem Kochsalz befreit. Dann wurde zum Filtrat etwa das 10 fache Volumen absoluten Alkohols hinzugefügt. Nunmehr schieden sich die Kristalle in langen Nadeln aus, und wurden dann

aus heissem Wasser umkristallisiert. Die Substanz ist N- und S-haltig, leicht in Wasser, aber nicht in absolutem Alkohol löslich und schmilzt bei 289°C. Diese Daten zeigen, dass der Kristall Taurin ist, und dass das Taurin in der Krötengalle als ein Paarling der Gallensäure vorkommt.

Zum Schlusse spreche ich Herrn Prof. Dr. T. Shimizu meinen herzlichsten Dank für die so freundliche Anleitung bei meiner Arbeit aus.

LITERATUR.

Okamura, T. (1928): Journ. of Bioch., **10**, 5.

Windaus (1926): Ann. d. Chem., **447**, 233.

STUDIES ON ENZYMIC SUBSTANCE CONTAINED IN KOJI MADE OF RICE IN DIFFERENT DEGREES OF ITS POLISHING.

By

MITSUJI ITO.

(From the Institute of Agricultural Chemistry, Hokkaido Imperial University.
Director: Prof. K. Miyake.)

(Received for publication, June 25, 1929.)

The general brewing matter made of polished rice, especially in the case of "Sake"¹⁾ brewing, is remarkably influenced in its quality by the degrees of polishing. This fact is due not only to the direct influence of the rice material which has different degrees of polishing, but also to the differences in the enzymic substance which is contained in different kinds of "Koji."²⁾

Koji is made mainly by the multiplication of *Aspergillus oryzae* in different ways according to the quality of the rice material. Therefore the action of the enzymes of Koji become characteristic.

The relation between the polishing and constitution of rice has been fairly well investigated. According to the study of S. Suzuki (1918), in "The relation between the polishing and composition of rice and wheat," as the degree of polishing heightens, the protein, fat, cellulose, ash, etc. contained in it seems to decrease, while the soluble nitrogen free substance increases. Also, according to the studies on protein in rice, made by Suzuki, Yoshimura and Fuji (Journal of Tokyo Chemical Society, 29, 1908), Kellner (Journal of Tokyo Chemical Society, 29, 1908), Rosenheim and Kajiura (Jour. Physiol., 36, 1908) and Taka-

1) "Sake" is Japanese alcoholic liquor brewed from polished rice.

2) "Koji" is a steamed grain which is infected with *Aspergillus oryzae*.

hashi and Sato (Journal of Tokyo Chemical Society, 32, 1911), we know that there are water soluble albumin, sodium chloride soluble globulin, alcohol soluble prolamin and sodium hydroxyde soluble oryzenin in rice protein; and oryzenin in very large quantity. In rice-bran there is twice as much protein as in polished rice, but the alcohol-soluble protein of polished rice is far greater, while the water soluble and sodium chloride soluble proteins of polished rice are rather lower in percentage than those of the rice-bran. Secondly, considering the relation between the polishing and the protein content of the sake brewing rice, we know from the study of T. Tadokoro and S. Watanabe (1924) made "On the degree of polishing and the protein content of the brewing rice," that protein, fat and ash vanish when rice is polished; and that fat and ash are largely removed with rice-bran, but that protein is not so rapidly removed beyond a certain degree of polishing. The amount of protein removed with rice-bran is in order of sodium hydroxyde soluble protein, sodium chloride soluble protein, water soluble protein and alcohol soluble protein, exactly coinciding with the order of protein contained in rice. From this fact we can affirm the direct relation between the composition of the material and the brewing matter produced from the material.

Looking over literature somewhat, though indirectly, useful to the author's investigation he found T. Takahashi and T. Yamamoto (1912) mentioning in "The comparative study between *Aspergillus oryzae* in "Sake-Tane-Koji"³⁾ and that in "Soy-" or "Tamari-Koji,"⁴⁾ that when each *Aspergillus oryzae* is set on the steam boiled rice or gelatin culture medium, the one from Sake-Koji has a weak gelatine liquefying power or weak protein liquefying activity, while the other one which comes from Soy- or Tamari-Koji has a weak power of sugar production, but has a comparatively strong protein liquefying activity. And this

3) "Tane-Koji" is the source of Koji infected with *Aspergillus oryzae*.

4) "Soy-Koji" and "Tamari-Koji, are soy-bean Koji, and the materials of Japanese sauce.

sort of tendency was especially remarkable in the main fungus of Tamari-Koji. And they inferred it to be the result of the repeated cultivation of *Aspergillus oryzae* which had been inured to its environment for hundreds of years. K. Oshima mentioned in his study, "The influence of the culture medium for the producing faculty of amylase and protease of *Aspergillus oryzae* and the comparison of the producing faculty of enzymes in various *Aspergillus oryzae*," that the amount of enzyme produced changed in accordance with the kind of culture medium. Moreover, he affirmed that a permanent difference does not appear in its productive faculty and form, even though it is cultured continuously ten times or more on every kind of culture medium; but he recognized that there is at least a difference in the producing amount of enzyme of *Aspergillus oryzae* according to the difference of culture medium.

The author has affirmed in his report, entitled "The Comparative Investigation of the Enzymic Power in Koji made of Different Kinds of Materials," (Ito, 1926), that by using the same Sake-Tane-Koji as a source of *Aspergillus oryzae* for polished rice, unpolished rice and soy bean, different kinds of Koji containing enzymes of different characteristics were obtained. And this fact was supposed to occur as the result of adaptability for demand and supply of nutrition according to the nature of the culture medium. Thus diastase was most powerful in the polished rice Koji containing comparatively a large amount of carbohydrate, while protease was powerful in the unpolished rice Koji and specially powerful in soy-bean Koji containing a comparatively large amount of protein.

Thus, the faculty of producing enzymic power in Koji depends upon the quality of raw material and the kind of *Aspergillus oryzae* itself; and it is probably an inevitable outcome of physiological mechanism for the multiplication of *Aspergillus oryzae*. But from the result of the author's studies on Koji-Diastase (Ito, 1926-8) and from literature of previous investigators on enzyme,

the author has come to the conclusion that Koji-Diastase is a kind of coalescential body of several factors. Thus, he thinks that the enzyme substance and the quality of materials or culture medium are in an intimate relation with each other, and that the active enzymic substance holds a suitable coalescential balance among the enzymic factors. The reason why this study is undertaken is not only to serve for the establishment of the factor theory on Koji-Diastase, but also to serve for the practice of Koji making as well as for Sake brewing.

A. ON THE ENZYMIC POWER IN EXTRACT SOLUTION OF KOJI MADE OF RICE IN DIFFERENT DEGREES OF POLISHING.

The preparation of samples used in this experiment are as follows:

1. *The Production of Koji.*

The material used in this experiment was third class-rice of Banshu, produced in 1927, and the polishing and further processes in the manufacture of the Koji were by "Kataoka Brewing Co.," in Sapporo. For polishing, the Shimizu polishing machine was used; and the rice was divided into six classes according to the difference in the degree in polishing such as unpolished, less by 5%, less by 10%, less by 15%, less by 20%, and less by 25%.

The Koji-making in this experiment conformed to the method for the less by 25% polished rice "Sake-Moto-Koji"⁵⁾ making. And the Tane-Koji which had been manufactured to use for the "Moto-Koji" making by M. Higuchi in Osaka was used at the ratio of 0.5 "Momme" per 1 "Sho"⁶⁾ of rice. But, generally, *Aspergillus oryzae* is difficult to break into unpolished rice compared with polished rice. So in the case of unpolished rice, Tane-

5) "Sake-Moto" is the source of "Sake" yeast.

6) 1 "Momme" corresponds to 15/4 grams. 1 "Sho" corresponds to 10/201 bushels.

Koji was added at the time of "Hikikomi"⁷⁾ of material at the rate of 0.75 Momme of Tane-Koji per 1 Sho of rice immediately,

TABLE I. Process of Koji-Manufacture.

Process	Date	Time	Room temperature (C).	Difference of wet and dry bulb temperatures (C).
Washing	Dec. 15	4 p.m.	—	—
Steeping	" 15-16	4 p.m., 15th— 2.30 a.m., 16th	5 (Temp. of water, 20)	—
Steaming	" 16	3 a.m.—4.30 a.m.	—	—
"Hikikomi" ⁷⁾	"	5 a.m.	26	0.5
"Tokomomi" ⁸⁾	"	1 p.m.	26.5	0.3
"Kirikaeshi" ⁹⁾	17	12.30 a.m.	27.7	0.3
"Mori" ¹⁰⁾	"	4 a.m.	26.1	0.1
"Nakashigoto" ¹¹⁾	"	7.30 a.m.	26	0.2
"Tsumikae"	"	11.30 a.m.	27	0.2
"Tomeshigoto" ¹²⁾	"	2.30 p.m.	27.5	0.1
"Tsumikae" ¹³⁾	"	8 p.m.	26.6	0.2
"Dekoji" ¹⁴⁾	" 18	2 a.m.	26.3	0.3

7) "Hikikomi": The process of carrying the steamed rice into the "Koji-room."

8) "Tokomomi": Rubbing with both hands to mix the steamed rice and the Tane-Koji on straw-mat-floor.

9) "Kirikaeshi": The process of mixing to make homogeneous the outer and inner parts of the materials.

10) "Mori": The process of heaping up the materials in "Koji-Futa," which is a flat shaped box making Koji.

11) "Nakashigoto": A process for the adjustment of the temperature of the materials in order to multiply suitably *Aspergillus oryzae* by means of rubbing the heaped materials to separate them from one another, and of controlling the manner of their heaping.

12) "Tomeshigoto": Extending the materials over the Koji-Futa, drawing three lines on the surface of the materials to adjust the temperature.

13) "Tsumikae": Transshipping the Koji-Futa to adjust the temperature of the materials.

14) "Dekoji": The final process of Koji-manufacture, taking out the Koji from the Koji-room.

TABLE I. (continued)

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Temperature of Materials (C).					
	0 (unpolished rice)	5	10	15	20	25
Washing	20	20	20	20	20	20
Steeping	20	20	20	20	20	20
Steaming	100	100	100	100	100	100
“Hikikomi”	52	52	52	52	52	52
“Tokomomi”	31.5	30.5	31	29.5	31	31
“Kirikaeshi”	33	34	33.5	33.5	33	33
“Mori”	33	34	33.5	33.5	33	33
“Nakashigoto”	37	37.3	37.5	39	39	38.5
“Tsumikae”	36.3	37.5	33.9	35.8	34	38.5
“Tomeshigoto”	38.5	38	35.5	36.5	37	37
“Tsumikae”	44	43.5	42	42	40	40
“Dekoji”	42	40.2	40.7	40	39	39.2

while to others added at the time of “Tokomomi.”⁸⁾ The above table I shows the process of the Koji-manufacture.

2. Preparation of enzyme solution.

Each sort of Koji was crushed roughly, and to each 300 gm. (as dry matter) there were added 1875 cc. distilled water and shaken well; then added 30 cc. of toluene, and left for 50 hours at 5–10°C., shaking it from time to time. Each solution obtained by Koji extraction was 1640 cc. in the case of unpolished rice Koji; 1525 cc., in the case of Koji, made of polished rice (less by 5%); 1548 cc. in the case of Koji made of polished rice (less by 10%); 1592 cc. in the case of Koji made of polished rice (less by 15%); 1572 cc. in the case of Koji made of polished rice (less by 20%); and 1562 cc. in the case of Koji made of polished rice (less by 25%); respectively. And the colour was deep yellowish in the case of unpolished rice Koji, diminishing in its rate according to the degree of polishing, and almost disappearing in the case of Koji

made of polished rice (less by 20 or 25%). These solutions were added with toluene as antiseptic, and preserved in a cool place to be used as enzyme solution. The results of the general analysis of the steeped rice, rice Koji and rice Koji extract enzyme solution used in this experiment are as follows:

TABLE II. Results of analysis of steeped rice (%).

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	0	5	10	15	20	25
Total nitrogen	1.808	1.665	1.586	1.488	1.299	1.214
Crude protein	11.304	10.407	9.913	8.298	7.992	7.586
Ether extract	1.790	1.140	0.790	0.770	0.750	0.740
Ash	1.726	1.085	0.863	0.513	0.398	0.392
Crude cellulose	1.483	1.018	0.513	0.189	—	—
Soluble nitrogen free substance	72.261	74.838	76.354	78.599	79.167	79.558
Water	11.436	11.512	11.567	11.634	11.693	11.724

The results obtained are almost similar to those of the analysis performed by the previous investigators concerning the relation between the rice polishing and its constitution. The crude protein, ether extract, ash, fiber and etc. are decreased in proportion to the degree of polishing, while the soluble nitrogen free substance has an increasing tendency. The steeped rice was one dried after its washing and steeping. Therefore, the steeped rice in each case was similar respectively to the one used for Koji-making above described, minus the Tane-Koji added to the material.

TABLE III. Results of analysis of rice Koji (%).

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	0	5	10	15	20	25
Total nitrogen	1.798	1.624	1.575	1.477	1.216	1.204
Crude protein	11.236	10.152	9.845	9.139	3.598	7.527
Ether extract	5.150	4.388	4.028	3.913	3.650	3.580
Ash	1.783	1.143	0.884	0.583	0.465	0.410
Crude fiber	1.578	1.136	0.683	0.213	0.058	0.046
Soluble nitrogen free substance	68.620	71.520	72.870	74.835	76.470	76.647
Water	11.633	11.661	11.690	11.717	11.859	11.787

The result in this table is almost similar to that of the steeped rice previously described. But, it must be noted especially in this table that the ether extract is increased considerably over that of the steeped rice in each case, while the soluble nitrogen free substance is decreased.

TABLE IV. Results of analysis of rice-Koji extract solution.
(Grams in 100 cc.).

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	0	5	10	15	20	25
Total nitrogen	0.0492	0.0375	0.0328	0.0287	0.0213	0.0212
Crude protein	0.3075	0.2344	0.2050	0.1794	0.1336	0.1325
Ash	0.1106	0.0762	0.0654	0.0592	0.0456	0.0414
Reducing sugar	1.6700	1.7800	1.9150	2.1631	2.2895	2.4160
Soluble nitrogen free substance	4.3287	3.8396	3.1702	3.1538	2.6838	2.6509
Total dry matter	4.7468	4.1402	3.4506	3.3924	2.8630	2.8248

According to the above investigation, the contents of crude protein, ash and reducing sugar change in accordance with the quality of rice material. We have also noticed that the difference in the constitutional quantity in the extract solution of rice-Koji, corresponded with the difference in the degree of polishing of the rice material.

It was also an interesting point that the total dry matter in Koji-extract solution decreased rapidly, while the soluble nitrogen free substance decreased gradually, proportionally to the degree of polishing of the rice material; though the quantity of the reducing sugar did not decrease in the Koji-extract solution, and the soluble nitrogen free substance contained in rice Koji itself was comparatively increased. And this should be considered from two standpoints such as liquefaction and saccharification of the soluble nitrogen free substance by Koji-Diastase. This shows that the Koji made of crudely polished rice is very powerful in the liquefying activity of carbohydrate compared with that of the Koji made of thoroughly polished rice, though the saccharifying activity does not prove itself so strong. Indeed, this sort of tendency should be considered to occur during the making or extracting of Koji. We shall try to prove this tendency with the following experiments on starch liquefying and saccharifying power and other things. Also the conception of factor theory on Koji-Diastase may be confirmed from the relation between the constitution of enzymic substance of Koji-Diastase and its action.

The result of the experiment on the Koji-extract is as follows:

3. Comparative test of starch liquefying power.

To 10 cc. of 2% potato starch paste was added 1 cc. of enzyme solution, and after a thorough shaking, 5 cc. of the mixture were put into the Ostwald's viscosimeter (distilled water, 58.75 seconds, at 38°C.) and digested at 38°C. and then the number of seconds used in falling down along the capillary tube were measured every 5 minutes. The result is shown in table V.

TABLE V. Starch liquefying power.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Time of digestion (minute)						
	1	5	10	15	20	25	30
0	4' 5.5''	1'19.2''	1'10.2''	1' 8.5''	1' 6.2''	1' 4.5''	1' 1.5''
5	4'22''	1'34.5''	1'21.5''	1' 8.5''	1' 8.5''	1' 8''	1' 6.5''
10	5'10''	2'20.6''	1'22.8''	1'14''	1'11.5''	1' 8.5''	1' 8.5''
15	5'20.2''	2'21.5''	1'32.6''	1'17.0''	1'11.5''	1' 8.5''	1' 8.5''
20	5'20.5''	2'21.6''	1'35''	1'17.5''	1'12''	1' 8''	1' 8.5''
25	5'23''	2'21.5''	1'40''	1'20''	1'15''	1'10''	1'10.5''

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Time of digestion (minute)					
	35	40	45	50	55	60
0	1' 3.8''	1' 4''	1' 4.5''	1' 4''	1' 1.8''	1' 0.2''
5	1' 4.8''	1' 4.5''	1' 2.2''	1' 4.2''	1' 4''	1' 3''
10	1' 5.2''	1' 4.5''	1' 2.5''	1' 4.5''	1' 5.2''	1' 5.5''
15	1' 5.5''	1' 5''	1' 2.5''	1' 4.5''	1' 5.5''	1' 5.5''
20	1'10''	1' 5.2''	1' 4''	1' 2.5''	1' 5.8''	1' 6''
25	1'11.5''	1' 7.5''	1' 3.5''	1' 3''	1' 6''	1' 6''

Control (To the starch paste was added distilled water)....12' 15.2''.

According to the result of this experiment, starch liquefying power in Koji-extract solution is most powerful in the case of the solution obtained from the unpolished rice Koji, and then it gradually decreases in cases of enzyme solution obtained from polished rice Koji in accordance with the difference in the degree of polishing of the rice. And the fact here obtained seems to have

an important relation with the constitution of enzymic substance in each extract solution.

4. *Comparative test of starch saccharifying power, (Diastase).*

To 25 cc. of 2% starch paste were added 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested for 20 hours at 38°C., and used 2.5 cc. of the digested solution. The result is shown in table VI.

TABLE VI. Starch saccharifying power.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration		Comparative number of KMnO_4 solution used for enzymic action (cc.)	Comparative number of glucose produced by enzyme (mg)	Digestibility (% of starch saccharified)
	Digested solution	Control (enzyme solution only)			
0	8.0	2.8	5.2	25.87	72.09
5	9.5	3.0	6.5	32.70	78.49
10	9.7	3.2	6.5	32.70	78.49
15	10.0	3.6	6.4	32.15	77.17
20	9.8	3.8	6.0	30.00	72.01
25	9.8	4.0	5.8	29.05	69.73

The starch saccharifying power of Koji-extract is weak in the unpolished rice Koji and most powerful in the Koji made of polished rice (less by 5–10%), and then it decreases in accordance with the decrease of rice polishing. But the falling of starch saccharifying power is not so rapid as the constitution of Koji-extract changes by the difference of polishing degree of rice used for Koji-making.

5. *Comparative test of maltose splitting power (Maltase).*

To 25 cc. of 2% maltose solution were added 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested for 20 hours at 38°C., used 2.5 cc. of the digested solution. The result is shown in table VII.

TABLE VII. Power of maltase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			Comparative number of KMnO_4 solution used for enzymic action (cc.)	Comparative number of glucose produced by enzyme (mg)	Digestibility (% of maltose split)
	Digested solution	Control (enzyme solution only)	Control (maltose solution only)			
0	7.9	2.8	4.3	0.8	7.72	18.56
5	7.8	3.0	4.3	2.5	22.63	54.31
10	9.9	3.2	4.3	2.4	23.32	55.96
15	10.0	3.6	4.3	2.1	20.60	49.96
20	9.8	3.8	4.3	1.7	16.42	39.40
25	9.7	4.3	4.3	1.4	13.44	32.26

The enzymic power of maltase is very weak in the unpolished rice Koji and most powerful in the Koji made of polished rice (less by 10%) then it decreases gradually according to the difference in the degree of polishing of rice material. But it is more rapid than in diastase. Moreover, the power of maltase is very weak in the unpolished rice Koji; and probably it may be attributed to the fact that maltase constitutionally can not take a suitable condition for the maltose splitting activity during the Koji making.

6. Comparative test of sucrose splitting power. (Invertase).

To 25 cc. of 2% sucrose solution were added 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toulene; digested for 20 hours at 38°C.; used 2.5 cc. of the digested solution. The result is shown in table VIII.

The enzymic power of invertase is very weak in the unpolished rice Koji and most powerful in the Koji made of polished rice (less by 5%); it gradually decreases as in the cases in diastase and maltase. But the degree in accordance with the polishing degree

TABLE VIII. Power of invertase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			Comparative number of KMnO_4 solution used for enzymic action (cc.)	Comparative number of invert sugar produced by enzyme (mg.)	Digestibility (% of sucrose splitted)
	Digested solution	Control (enzyme solution only)	Control (sucrose solution only)			
0	8.6	2.3	0.7	5.1	25.37	60.84
5	11.5	3.0	0.7	7.8	39.67	95.11
10	11.6	3.2	0.7	7.7	39.11	93.79
15	11.7	3.6	0.7	7.4	37.50	89.93
20	11.3	3.8	0.7	6.8	34.27	82.18
25	11.2	4.0	0.7	6.5	32.72	78.94

of the rice is not so large as in the constitution of Koji-extract solution.

7. Comparative test of enzymic power of pepsin.

To 15 cc. of 2.5% casein solution were added 5 cc. of enzyme solution, 1.2 cc. of N/1 HCl solution and 2 cc. of toluene; digested in 45 hours at 38°C .; after the digestion 0.3 cc. of N/1 HCl and 9 cc. of 20% Na_2SO_4 solution were added to the digested solution to make it precipitated and estimate the protein which was not yet digested quantitatively. Then the digested casein was calculated from the result of the undigested casein to compare the enzymic power in both. (Using the Volhard's casein method.) The result is shown in table IX.

The enzymic power of pepsin is very powerful in the unpolished rice Koji; gradually decreasing in accordance with the polishing degree of rice used for Koji-making. This tendency is different from the case of the previous carbohydrate splitting enzymes, and

TABLE IX. Power of pepsin.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Casein not digested (g)		Casein digested by enzyme (g)	Digestibility (% of casein digested by enzyme)
	Digested solution	Control (casein solution only)		
0	0.2808	0.3651	0.0843	23.09
5	0.3129	0.3651	0.0522	14.29
10	0.3163	0.3651	0.0488	13.37
15	0.3240	0.3651	0.0411	11.26
20	0.3272	0.3651	0.0379	10.38
25	0.3298	0.3651	0.0353	9.64

is a very interesting point compared with the constitution of Koji-extract.

8. Comparative test of enzymic power of trypsin.

To 15 cc. of 2.5% casein solution were added 5 cc. of enzyme solution, 1.2 cc. of N/1 NaOH solution and 2 cc. of toluene; digested for 45 hours at 38°C., after the digestion 2.1 cc. of N/1 HCl and 9 cc. of 20% Na₂SO₄ solution were added to make it precipitated, and estimate the protein which was not digested. The enzymic power was compared as in the case of pepsin. The result is shown in table X.

The power of trypsin has a tendency to gradual decrease as in the case of pepsin, and is especially powerful in unpolished rice Koji.

9. Comparative test of enzymic power of lipase.

To 10 cc. of 10% olive oil emulsion were added 10 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested for 40 hours at 38°C.; after digestion 40 cc. of 99% alcohol and 5 cc. of ether were added, and titrated with N/10 KOH solution constantly adding phenolphtha-

TABLE X. Power of trypsin.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Protein not digested (g)		Casein digested by enzyme (g)	Digestibility (% of casein digested by enzyme)
	Digested solution	Control (casein solution only)		
0	0.2715	0.3659	0.0944	25.79
5	0.3043	0.3659	0.0616	16.83
10	0.3071	0.3659	0.0586	16.01
15	0.3136	0.3659	0.0523	14.29
20	0.3175	0.3659	0.0484	13.10
25	0.3175	0.3659	0.0484	13.10

lein as indicator till it becomes a slightly rose coloured solution. And we obtained the quantity of acids, which had been produced by lipase from the fat in the digestive experiment, from the difference between the number of cc. of the KOH solution used for neutralization and that of control. The result is shown in table XI.

TABLE XI. Power of lipase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of N/10 KOH solution used for titration			cc. of N/10 KOH solution used for neutralization of fatty acids produced by enzyme
	Digested solution	Control (enzyme solution only)	Control (olive oil emulsion only)	
0	4.5	2.5	0.9	1.1
5	4.2	2.4	0.9	0.9
10	3.5	1.9	0.9	0.7
15	3.4	1.9	0.9	0.6
20	3.4	1.9	0.9	0.6
25	3.2	1.8	0.9	0.5

The enzymic power of lipase is most powerful in the unpolished rice Koji, and gradually decreases corresponding to the degree of polishing of rice. From the results of previous experiments we can see fairly well the relation between the enzymic power and constitution of the extract solution of various Koji made of rice in different degrees of polishing.

Now the author wishes to describe something about purified enzymic substance of Koji-Diastase to show the correlation between the constitution of Koji-extract itself and its enzymic action substantially.

B. ON THE PURIFIED DIASTATIC ENZYME SUBSTANCE OF KOJI
MADE OF RICE WITH DIFFERENT DEGREE OF POLISHING.

The preparation of the sample used in this experiment is as follows:

1. *Preparation of Koji-Diastase enzyme substance.*

Rice material: A 3rd class rice of Banshu was used, and the descending degree of rice material caused by its polishing (%) was 0 (unpolished rice), 5, 10, 15, 20 and 25. Preparation of enzyme solution: 1.5 kgs. of each Koji which was the same used in the experiment "A"; namely 1193.25 gm., 1148.55 gm., 1165.95 gm., 1144.80 gm., 1108.05 gm. and 1106.55 gm. of Koji (as dry matter) were taken and added respectively about 1.815 times in volume (for 1 gm. of Koji added 1.815 cc. of water) namely 2185.6 cc., 2084.2 cc., 2115.0 cc., 2078.0 cc., 2011.2 cc., 2008.0 cc., of 20% alcohol solution (volume), and extracted for 45 hours at room temperature and obtained each 1190 cc., 974 cc., 990 cc., 898 cc., 818 cc. and 818 cc. of the filtrate (not pressed).

The ratio of the extract (volume %) for the quantity of each dry matter of Koji was as follows:

	Descending degree of rice caused by its polishing (%)					
	0	5	10	15	20	25
Ratio (Volume %)	99.8	84.8	84.9	78.4	73.8	73.9

According to the result, the absorbing quantity of water increased in accordance with the polishing degree of rice used for Koji as material. Thus it may be supposed that the quality of Koji is influenced by the polishing degree of rice used for Koji, as probably the conditions of propagation of *Aspergillus oryzae* become different.

Preparation of enzyme substance: To 800 cc. of each Koji extract solution (20% alcohol) were added 3500 cc. of 95% alcohol—the mixture was 81.465% in its alcoholic concentration; and the precipitated matter was filtered after 15 hours, having been shaken

TABLE XII.
Yield of the diastatic enzyme substance obtained from Koji.

	Descending degree of rice caused by its polishing (%)					
	0	5	10	15	20	25
Enzyme substance obtained from 800 cc. of the Koji-extract solution(g).	4.993	2.999	2.995	3.756	3.107	3.100
Total quantity of enzyme substance obtained from the extract of 1.5 kgs. of Koji.	13.527	7.813	7.918	9.756	7.801	7.782
Yield of enzyme substance for dry matter of Koji.	1.134	0.680	0.679	0.852	0.704	0.703
Real yield of enzyme substance for Koji (Lintner's method, %).	0.495	0.243	0.247	0.281	0.212	0.211

well from time to time; washed and weighed. Here every precipitated part was used as enzyme substance of Koji-Diastase respectively.

According to the result of this experiment, the quantity of purified diastatic enzyme substance of rice-Koji is greatest in the unpolished rice-Koji, decreasing at first in proportion to the polishing degree of rice, and then increasing, after which again decreasing, to be shown in a sort of a wave. Hereby, it must probably be recognized that this phenomenon depends not only upon the quality of rice material, but also upon the mutual relation between each constituent of Koji as a secondary natural consequence of the propagation of *Aspergillus oryzae*. And at the same time it may be supposed that the enzymic action is perhaps a kind of sub-ordinate correlative phenomenon accomplished by the enzymic substance in mutual harmony between each constituent.

Preparation of enzymic solution: 0.5 gm. of dry purified Koji-Diastase were dissolved with distilled water and made up to 100 cc.; and the insoluble matter was filtered. So here was about 0.5% enzyme solution left over, the insoluble matter being quite negligible. The enzyme power in the Koji-Diastase enzyme solutions was carefully compared with the result, as following:

2. *Comparative test of starch liquefying power.*

To 5 cc. of 2% potato starch paste was added 1 cc. of enzyme solution; the mixture was shaken thoroughly, following which 5 cc. of the mixture was put into Ostwald's viscosimeter (distilled water, 58.75" at 38°C.) and digested at 38°C., and the descent along the capillary tube was measured every five minutes by the denomination of seconds. The result is shown in table XIII.

According to the result of this experiment, the comparative value of starch liquefying power performed by the unit quantity of the purified Koji-Diastase is largest in the unpolished rice-Koji, and gradually decreases, corresponding with the polishing degree of rice material.

TABLE XIII. Starch liquefying power.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Time of digestion (minute)						
	1	5	10	15	20	25	30
0	1'19"	1' 4.25"	1' 0.75"	1' 0.5"	1'	59.75"	1' 3.5"
5	1'32"	1'10"	1' 5.75"	1' 4.25"	1' 2.5"	1' 3.75"	1' 2.25"
10	1'32"	1'10.5"	1' 6"	1' 4.5"	1' 4.25"	1' 3.75"	1' 5"
15	1'37.75"	1'16.25"	1'14.75"	1'15.25"	1'11"	1'14.25"	1'13"
20	1'32.25"	1'15.75"	1'14.5"	1'13.75"	1'12.75"	1'12.75"	1'14.25"
25	1'31.5"	1'15.25"	1'14.5"	1'12.75"	1'13"	1'15.5"	1'15.5"

(continued)

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Time of digestion (minute)					
	35	40	45	50	55	60
0	1' 1.75"	1' 1"	1' 0.75"	1' 0.25"	1' 1.75"	1' 0.5"
5	1' 2"	1' 2.5"	1' 2.75"	1' 2.5"	1' 2.5"	1' 5"
10	1' 3"	1' 2.75"	1' 2.5"	1' 2.5"	1' 2.25"	1' 2.25"
15	1'11.5"	1' 9.25"	1' 8"	1'11.75"	1'10.5"	1' 9.25"
20	1'14.75"	1'14.25"	1'15.25"	1'14.5"	1'14"	1'13.75"
25	1'14.75"	1'14.25"	1'14"	1'15.75"	1'14.25"	1'14.75"

Control (To the starch paste was added distilled water).....13 12.75"

3. Comparative test of starch saccharifying power (Diastase).

To 25 cc. of 2% starch paste were added 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested at 38°C., 5 cc. of the digested solution used.

TABLE XIV. Starch saccharifying power.
(Case of 5 hour digestion).

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			cc. of KMnO_4 solution used for enzymic action		Glucose produced by enzyme (mg)		Digestibility (%)	
	Starch	Soluble starch	Control (enzyme solution only)	Starch	Soluble starch	Starch	Soluble starch	Starch	Soluble starch
0	12.10	13.30	0.40	11.55	12.60	61.59	67.76	73.91	81.31
5	12.45	13.80	0.45	11.85	13.05	63.35	70.44	76.02	84.53
10	12.45	13.80	0.40	11.85	13.05	63.35	70.44	76.02	84.53
15	12.80	14.10	0.50	12.15	13.20	65.15	71.94	78.18	86.33
20	12.55	13.80	0.40	11.95	13.05	63.94	70.44	76.73	84.53
25	12.60	13.60	0.50	11.95	12.80	63.94	68.49	76.73	82.19

Control (Starch paste) 0.15

Control (Soluble starch solution) 0.30

(Case of 18 hour digestion).

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			cc. of KMnO_4 solution used for enzymic action		Glucose produced by enzyme (mg)		Digestibility (%)	
	Starch	Soluble starch	Control (enzyme solution only)	Starch	Soluble starch	Starch	Soluble starch	Starch	Soluble starch
0	12.60	13.40	0.40	12.05	12.70	64.53	68.35	77.49	82.02
5	12.70	14.10	0.45	12.10	13.35	64.82	72.25	77.78	86.70
10	12.70	14.10	0.40	12.15	13.40	65.12	72.56	78.14	87.07
15	13.05	14.20	0.50	12.40	13.40	66.59	72.56	79.91	87.07
20	12.95	14.55	0.40	12.40	13.85	66.59	75.75	79.91	90.90
25	13.05	14.55	0.50	12.40	13.85	66.59	75.75	79.91	90.90

According to the result of this experiment (Table XIV), the comparative value of diastatic power performed by the unit quantity of the purified Koji-Diastase shows a tendency of gradual increase from the unpolished rice-Koji in correspondence with the polishing degree of rice used as material of the Koji, as well as with the quantity of soluble non-nitrogenous material in the rice-Koji or in the enzymic substance. But, in the case of a short time action as 5 hours digestion, the extract of Koji made of rice less by 15% in its polishing degree has the most powerful diastatic activity.

4. *Comparative test of maltose splitting power. (Maltase).*

To 25 cc. of 2% maltose solution were added 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested at 38°C. for 18 hours; then 5 cc. of the digested solution was used.

TABLE XV. Power of maltase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			cc. of KMnO_4 solution used for enzymic action	Glucose produced by enzyme (mg)	Digestibility (% of maltose split)
	Digested solution	Control (enzyme solution only)	Control (maltose solution only)			
0	12.40	0.40	7.70	4.30	43.06	51.67
5	13.20	0.45	7.70	5.05	50.94	61.13
10	13.15	0.40	7.70	5.05	50.94	61.13
15	13.40	0.50	7.70	5.20	52.52	63.02
20	13.30	0.40	7.70	5.20	52.52	63.02
25	13.40	0.50	7.70	5.20	52.52	63.02

The comparative value of maltose splitting power performed by the unit quantity of the purified Koji-Diastase shows a tendency of gradual increase in proportion to the polishing degree of rice

used as material; and is largest in the case of Koji made of rice, less 15% of its polishing degree. The power is very weak in the unpolished rice-Koji.

5. *Comparative test of sucrose splitting power. (Invertase).*

To 25 cc. of 2% sucrose solution were added 5 cc of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested for 18 hours at 38°C.; then 5 cc. of the digested solution used.

TABLE XVI. Power of invertase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of KMnO_4 solution used for titration			cc. of KMnO_4 solution used for enzymic action	Inverte sugar produced by enzyme (mg)	Digestibility (% of maltose splitted)
	Digested solution	Control (enzyme solution only)	Control (sucrose solution only)			
0	11.00	0.40	1.10	9.50	49.78	59.47
5	14.90	0.45	1.10	13.35	72.69	87.23
10	15.00	0.40	1.10	13.50	73.63	88.36
15	15.10	0.50	1.10	13.50	73.63	88.36
20	15.00	0.40	1.10	13.50	73.63	88.36
25	15.10	0.50	1.10	13.50	73.63	88.36

The comparative value of sucrose splitting power (See table XVI) performed by unit quantity of the purified Koji-Diastase shows a tendency of gradual increase as in diastase and maltase above mentioned, and is largest in the Koji made of rice less 15% on its polishing degree. It is also worthy of note that the power is especially weak in the unpolished rice-Koji.

6. *Comparative test of enzyme power of pepsin.*

To 1.1 cc. of N/1 HCl were added 13.9 cc. of distilled water, 10 cc. of 5% casein solution, 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of

toluene; digested for 40 hours at 38°C. To the digested solution 0.5 cc. of N/1 HCl and 10 cc. of 20% Na₂SO₄ were added to make a precipitation in order to estimate the casein still undigested. The digested casein was obtained from the difference between the control and the undigested casein to estimate the enzymic power.

TABLE XVII. Power of pepsin.

Descending degree of rice caused by its polishing(%)	Undigested casein(g)	Casein digested by enzyme(g)	Digestibility (% of casein digested by enzyme)
0	0.4455	0.0250	5.31
5	0.4565	0.0140	2.97
10	0.4580	0.0125	2.64
15	0.4570	0.0135	2.87
20	0.4555	0.0150	3.17
25	0.3660	0.1045	22.23
Contro test (casein only)	0.4705	—	—

7. Comparative test of enzymic power of trypsin.

To 15 cc. of distilled water were added 10 cc. of 5% casein solution, 5 cc. of enzyme solution and 2 cc. of toluene; digested for 40 hours at 38°C; after digestion to the solution 1.5 cc. of N/1 HCl and 10 cc. of 20% Na₂SO₄ solution were added to make precipitate the digested casein in order to weigh it quantitatively. The enzymic power was compared as in the case of pepsin.

The comparative value of casein splitting power performed by protease such as pepsin (Table XVII) or trypsin (Table XVIII) in the unit quantity of the purified Koji-Diastase gradually decreases, at first corresponding with the polishing degree of rice used as material, and is smallest in the case of Koji made of rice less by 10% on its polishing degree; then gradually increases as

TABLE XVIII. Power of trypsin.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Casein not digested (g)	Casein digested by enzyme (g)	Digestibility (% of casein digested by enzyme)
0	0.2916	0.1807	38.26
5	0.3165	0.1568	33.20
10	0.3198	0.1525	32.29
15	0.3008	0.1715	36.31
20	0.3002	0.1721	36.44
25	0.0695	0.4028	85.28
Control test (casein only)	0.4723	—	—

follows. It is largest in the Koji made of rice less by 25% on its polishing degree. The Koji used in this study was made by the method of the less by 25% polished-rice-Sake-Moto-Koji-making. Hence we may gather from the facts stated above, that each part of enzymic factors in the Koji made of rice less by 25% attains the best coalescential state for the protein splitting activity. According to this consideration, this sort of enzymes such as pepsin or trypsin seems to be more strongly influenced by the coalescential character of enzymic factors compared with carbohydrate splitting enzymes. Thus it may be also supposed that the producing faculty of the protease does not only depend upon the quantity of substrate such as proteineous substance contained in the Koji material, but is also influenced secondarily by the propagating state of the *Aspergillus oryzae* for the material.

8. Comparative test of enzymic power of lipase.

To 10 cc. of 10% olive oil emulsion were added 5 cc. of enzyme solution, 5 cc. of distilled water and 2 cc. of toluene; digested for 40 hours at 38°C.; to the digested solution 40 cc. of 99% alcohol and 5 cc. of ether were added and titrated with N/10 KOH solu-

TABLE XIX. Power of lipase.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	cc. of N/10 KOH solution used for titration		Control (olive oil emulsion only)	cc. of N/10 KOH solution used for neutralization of fatty acid produced by enzyme
	Digester solution	Control (enzyme solution only)		
0	1.80	0	0.95	0.85
5	1.50	0	0.95	0.55
10	1.50	0	0.95	0.55
15	1.45	0	0.95	0.50
20	1.45	0	0.95	0.50
25	1.45	0	0.95	0.50

tion adding phenolphthalein as indicator until it becomes slightly rose colour. Thus the difference between the number of cc. of the KOH solution used for neutralization and that of the control may be considered the quantity of acids which was produced by lipase from the fat in the digestive experiment.

The comparative power of lipase (Table XIX) in the unit quantity of purified Koji-Diastase shows a tendency of gradual decrease corresponding with the polishing degree of rice used as material; it is especially large in the unpolished rice-Koji.

9. *Comparative value of total enzymic power in each of enzymes in the purified Koji-Diastase enzyme substance.*

The comparative value of total enzymic power in each of enzymes in the purified Koji-Diastase enzyme substance is calculated from the comparative number of each enzymic power for the unit quantity of the purified Koji-Diastase enzyme substance and the yield of the enzyme substance for dry Koji. The result is shown in table XX: (The time of digestion, 18 hours.)

From the table we can see that the starch liquefying power of Koji-diaastase is most powerful in the unpolished rice-Koji; then

TABLE XX. Comparative total enzymic power.

Descending degree of rice caused by its polishing (%)	Yield of enzyme substance for dry matter of Koji (%)	Starch liquefying power	Diastase	
			Starch	Soluble starch
0	1.134	High	87.874	93.011
5	0.680	↓	52.890	58.956
10	0.679	Low	53.057	59.121
15	0.852	Low	68.083	74.184
20	0.704	Low	56.257	63.994
25	0.703	Low	56.177	63.903

(Continued)

	Maltase	Invertase	Pepsin	Trypsin	Lipase
0	59.594	67.745	6.022	42.387	High
5	41.568	59.316	2.020	22.576	↓
10	41.507	59.996	1.793	21.925	Low
15	53.693	75.283	2.445	30.936	Low
20	44.366	62.205	2.239	25.654	Low
25	44.303	62.117	15.628	59.952	Low

it decreases gradually to some extent; so is the starch saccharifying activity most powerful in the unpolished rice; then it decreases at first, and again becomes powerful in the Koji made of rice less by 15%; and then takes once more a decreasing tendency. Although maltase of Koji has a sort of tendency as in the case of diastase, it is not influenced very much by the difference in the degree of polishing of the rice. Invertase has also such a tendency,

and its power is most powerful in the Koji made of rice less by 15%, and the unpolished rice Koji comes next. The so called trypsin is more powerful in its activity than pepsin. And the power of proteolytic enzyme gradually decreases first in the case of Koji made of rice less by 10%; increases in the case of Koji made of rice less by 15%, and slightly decreases in the case of Koji made of rice less by 15%, and slightly decreases in the case of Koji made of rice less by 20%; and then increases again to become most powerful in the case of Koji made of rice less by 25%. Therefore we can probably say that the protease seems to have complex coalescential character compared with the carbohydrate splitting enzymes.

Lastly lipase is most powerful in the case of the unpolished rice-Koji, and gradually decreases till there is no noticeable difference as its power grows so weak.

10. *Constitution of the purified Koji-Diastase enzyme substance. (%)*.

TABLE XXI.

Descending degree of rice caused by its polishing	Soluble nitrogen free substance	Nitro-geous substance	Ash	Total	Difference
0	43.61	41.50	13.30	98.41	-1.59
5	52.39	39.63	6.00	98.02	-1.98
10	54.11	40.25	4.70	99.06	-1.94
15	54.67	41.63	3.10	99.30	-0.70
20	55.53	42.13	3.00	100.66	+0.66
25	55.53	42.38	3.00	100.91	+0.91

According to the result, as shown in table XXI, the influence of the polishing degree of rice used as material for Koji upon the constitution of the purified Koji-Diastase enzyme substance obtained

by Lintner's method is observed as follows: The nitrogen free substance increases in correspondence with the polishing degree of rice used for Koji; and the nitrogeneous substance does not so differ though it decreases in the case of Koji made of rice less by 5%, and then increases gradually till it is largest in the case of Koji made of rice less by 25%. Such a fact seems to occur as a secondary influence of the state of propagation of *Aspergillus oryzae* for rice material, when we consider this relation from the constitution of the rice material itself, and it seems an important matter compared with the change of enzymic power of protease. Finally, the ash ingredient gradually decreases. These points exactly coincide with the state of changing of the comparative value of enzymic power in most cases.

Now the facts obtained from these experiments may be summarized as follows:

1. The purified Koji-Diastase containing a large quantity of ash ingredient is comparatively powerful in its starch liquefying activity.
2. The one containing a large quantity of soluble nitrogen free substance is comparatively powerful in its diastatic activity.
3. The one containing a large amount of nitrogeneous substance is comparatively powerful in its proteolytic activity.

Moreover, as the Koji-Diastase enzyme substance cannot be extracted exhaustively from the Koji-extract solution by Lintner's method, the diastatic power is still recognizeable in the filtrate. And it may be supposed that the coalescent state of enzyme solution in the Koji-extract solution does not always perfectly coincide with that of the enzyme substance in the purified enzyme solution. It is probable that there may be some substances which can be substituted mutually as a kind of enzymic factor, while at the same time there may be different factors which can not be used as substitutes for one another.

CONCLUSION.

From results of studies made by many scholars on enzyme, especially on diastase, and that of the former studies on Koji-Diastase performed by the author, especially on the artificial enzyme (Ito, 1926-28), as well as from the result of the present investigation, we come to the conclusion as follows:

It is generally to be admitted that the Koji-Diastase enzyme substance is produced by the reciprocal action of the *Aspergillus oryzae* and the rice material itself, provided there be some water. That is to say, the constituents of the rice material must be absorbed by *Aspergillus oryzae* after it is decomposed by the enzymic substance which is present in the spore of *Aspergillus oryzae* or in Tane-Koji; and, as consequently there occurs a synthesis or propagation of *Aspergillus oryzae* itself, it is necessary that *Aspergillus oryzae* should always adapt itself to the surrounding culture medium.

Thus the action of various enzymes secreted from *Aspergillus oryzae* will differ by the constitution of rice material itself; so, as a right consequence, the propagation of *Aspergillus oryzae* occurs suited to the constituents of the substrate decomposed by its enzyme. Therefore it is to be seen that various kinds of Koji possessing various enzymic activities are produced from different kinds of materials.

Matters which are supposed to be a kind of enzymic factor of Koji-Diastase, from the stand-point of the author's hypothesis "Factor theory of Koji-Diastase," are the substances such as some secreting matters of *Aspergillus oryzae* and some kind of rice decomposed product not yet used for the propagation of *Aspergillus oryzae*, or some kind of substance which has not yet made a complete synthetic action in the fungus body. Also it should be remembered that these substances are able at least to permeate through the fungus membrane such as lower polypeptides between amino acid and peptone, lower carbohydrates of aldohexose series

between saccharoid and dextrine, and ash ingredients, such as Mg, PO_4 , K, Ca, SO_4 and Na; ever holding a good coalescent state between them.

It is to be understood that the ash ingredients, especially, exist as a most important factor for the starch liquefying activity; the materials of lower carbohydrate series, for the carbohydrate splitting activity; and the nitrogenous substance, for the protein splitting activity.

From results of the present investigation, it is also obvious that each Koji made of rice in different degree of its polishing is different in its quality and enzymic activity, so that it is comparatively easy to use a right kind of Koji in brewing different Sake. Generally speaking, when a crudely polished rice-Koji is used, and decomposition and fermentation are hastened in the course of Sake-brewing, the temperature of "Moromi"¹⁵⁾ becomes high, making it strongly yellowish and flavorless, so that it often becomes difficult to prove itself a superior stuff. On the contrary, when we use a good polished rice-Koji and ferment it gradually in a proper temperature, in most cases we shall get an excellent slightly yellowish, flavoured product. And there are two kinds of Sake such as "Karakuchi" and "Amakuchi,"¹⁶⁾ but those do not necessarily mean the quality of Sake. "Amakuchi" Sake seems to be easily obtained from a highly polished material, compared with "Karakuchi." But in general, the special character of Sake must not be decided only by the degree of the polishing of rice. So we should be careful to observe every condition in the course of Sake-brewing to obtain an excellent stuff, using the same material. But at any rate the polishing degree of rice material must be first considered; and the polishing degree should be adapted to the propagation of *Aspergillus oryzae* on Koji-making and to the growth of yeast at

15) "Moromi" is the brewing mixture of Koji, steamed rice, the source of Sake yeast and water.

16) "Amakuchi" means sweet taste and "Karakuchi" means not such a sweet taste.

the fermentation from the stand point of nutrition for the microorganisms. At the same time the useless and harmful material should be thoroughly removed.

Lastly, the quality of Koji does not always need to be especially strong in its enzymic activity; but it is important that there should be a harmonious function in various directions, as in uniformly producing necessary substances for the growth of yeast, and in keeping up the fermentation of the thus produced substance, ever trying to provide conditions capable of holding a fair harmony between alcohol and other various products. This sort of mutual action is of course influenced remarkably by external conditions and various processes in the course of brewing. Therefore these processes must be properly carried out according to the nature of rice and rice-Koji as material, and observing always the opportune season for brewing various kinds of Sake.

LITERATURE.

- Ito, M. (1926): Jour. of Brewing Soc. (Japanese), **4**, 394-416.
Ito, M. (1926-8): Jour. of Brewing Soc. (Japanese), **4**, 394-416, 730, 987;
5, 12, 192, 253, 421, 499, 669, 729, 807.
Suzuki, S. (1918): Jour. of Agricultural Soc. (Japanese), No. 187, 189.
Tadokoro, T. and Watanabe, S. (1924): Jour. of Sapporo Agricultural Soc. (Japanese), **65**, 126-134.
Takahashi, T. and Yamamoto, T. (1912): Jour. of Tokyo Chem. Soc. (Japanese), **32**, 454-476.

ÜBER DIE FERMENTATIVE SPALTUNG DER VERSCHIEDENEN PHOSPHORSÄUREESTER.

VON

KATSURA ASAKAWA.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 29. Juni 1929.)

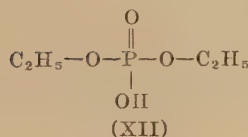
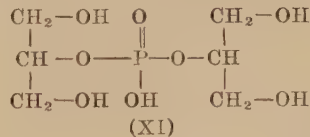
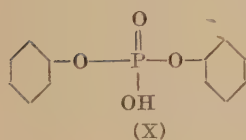
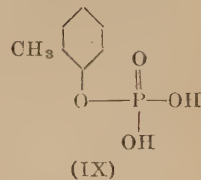
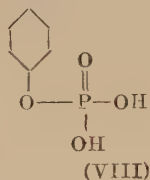
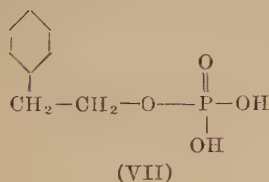
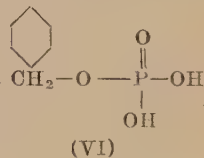
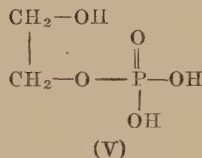
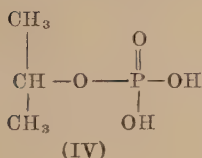
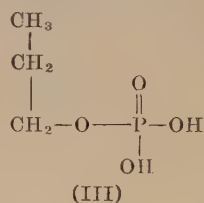
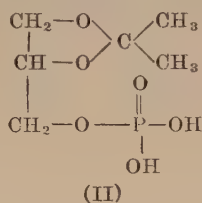
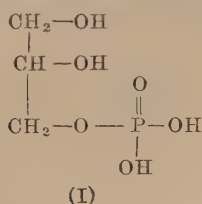
Die Fermentwirkung ist abhängig von der Wasserstoffzahl des Mediums. Diese längst bekannte Tatsache wurde aber noch nicht ganz klar erklärt. Michaelis (1911, 1914, 1920) war der Erste, der sich eingehend mit dieser Frage beschäftigte. Er hat bei verschiedenen Fermenten die Ph-Aktivitätskurve ermittelt, und aus der Form dieser Kurve und dem Wanderungssinne des Ferments im elektrischen Felde zog er den Schluss, dass die katalytische Wirkung von einer bestimmten Dissoziationsform des Ferments, nämlich von Fermentsanion, Fermentskation oder undissoziierten Fermentsmolekülen ausgeführt wird, und dass der Ph-Einfluss auf die Fermentwirkung kein anderer ist, als der auf die Ionisation des Fermentelektrolyten. Diese schöne Erklärung steht aber im Gegensatz zu der Anschauung von Northrop (1920, 1923). Man sieht aus dessen ausgezeichneten Untersuchung mit dem proteolytischen Ferment, dass die Ph-Aktivitätskurve je nach den verschiedenen Eiweissarten veränderlich ist, aber mit der Dissoziationskurve der Substrate auffallend übereinstimmt. Wenn wir das Ergebnis des Überführungsversuchs mit Pepsin von Pekelharing und Ringer (1911) in Betracht ziehen, so scheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass die Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration bald von der elektrochemischen Natur des Ferments, bald von der des Substrats bestimmt wird. In dem ersten Fall handelt es sich um einen Nichtelektrolyt, z.B. Rohrzucker bei Saccharase, und im zweiten Fall z.B. um Eiweiss, das je nach der Wasserstoffzahl den Dissoziationsgrad verändert.

Dieser Schluss, der aus Experimenten bei elektrochemisch extrem stehenden zwei Substraten gezogen wurde, hat selbstverständlich keine Allgemeingültigkeit. Wie sich die elektrochemische Natur des Ferments oder des Substrats bei der Fermentwirkung verhält, war daher der Gegenstand unserer genaueren Untersuchung. Wir haben dazu Substrate benutzt, die einfach aufgebaut, stufenweise dissoziierbar und enzymatisch hydrolysierbar sind. Das erste Substrat war Monophosphorsäureester und der Versuch wurde mit dem β -Glycerophosphat angefangen. Phosphatase, die solche Ester spaltet, findet sich im Pflanzen- und Tierreich. Nach unserer Untersuchung ist dieses Ferment aber nicht einheitlich. Die pflanzliche Phosphatase, z.B. Taka-Phosphatase aus *Aspergillus oryzae*, ist etwas ganz Anderes als die tierische, z.B. Nierenphosphatase. Die nach Kobayashi (1927) und Inouye (1928) gereinigte Taka-Phosphatase hat eine typische Dissoziationskurve von P_k 4,8 und das Ph-Optimum bei Ph 2,8. Nach der sauren Seite fällt diese Kurve ziemlich steil ab. Wir haben diese Kurve als die Dissoziationsrestkurve des Ferments-ampholyten angenommen. Voriges Jahr hat der Verfasser die Darstellungsmethode der Nierenphosphatase und seine Studien über diese Phosphatase veröffentlicht. Dieses Ferment hydrolysierte das Glycerophosphat (Kahlbaum) optimal in schwach alkalischer Reaktion. Die optimale Acidität war aber je nach der Konzentration des Substrats beweglich. Die graphische Zeichnung der Ph-Aktivitätskurve führte dann den Verfasser zu dem Ergebnis, dass dieses Ferment, wie ein Elektrolyt, nach der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums den Dissoziationsgrad verändert, und zwar entlang einer typischen Dissoziationskurve von P_k 9,2*, obwohl der ganze Verlauf der theoretisch angenommenen Kurve infolge der Alkaliempfindlichkeit des Ferments nicht verwirklicht werden konnte. Es war ausserdem sehr auffallend, dass die Nierenphosphatase und die Taka-Phosphatase ganz unabhängige Wirkungen

* Berichtigung zu der vorigen Mitteilung (diese Zeitschrift, 10, 57): Auf S. 171,4. und 5. Zeile muss es statt Ph 8,2 heissen: Ph 9,2.

entfalteten. Die optimale Acidität des letzten Ferments war Ph 3,1. Die Ph-Aktivitätskurve der beiden Phosphatasen stand gegeneinander, wie ein Spiegelbild, an den beiden Seiten des Neutralpunkts, Ph 7.

Das zu dem Experiment benutzte Substrat war das umkristallisierte Glycerophosphat von Kahlbaum, das β -Glycerophosphat mit fünf Molekülen Kristallwasser. Der folgende Versuch wurde mit verschiedenen synthetischen Phosphorsäureestern ausgeführt.



α -Glycerophosphorsäure (I) wurde zuerst zum Experiment benutzt. Dieser Ester wurde, wie β -Ester, in der Konzentration von M/1000 von Nierenphosphatase bei Ph 9 optimal hydrolysiert. Das Verhältnis bei der Taka-Phosphatase war aber anders. Die optimale Spaltung des β -Esters wurde, wie bei den früheren Versuchen, in Ph 3 beobachtet. Mit derselben Fermentlösung war der α -Ester bei Ph 5,54 optimal spaltbar. Bei dieser Acidität war die Geschwindigkeit der Hydrolyse der beiden Ester fast gleich, aber als die Acidität z.B. zu Ph 3 verstärkt wurde, war die Differenz des Verhaltens der beiden Ester ganz deutlich bemerkbar. Die Spaltung des β -Esters fand dann ihre besten Bedingungen, dagegen wurde der α -Ester in weit geringerem Masse gespalten.

Acetonglycerophosphorsäure (II), deren Glycerinrest an den übrigen OH-Gruppen, nämlich bei α' - und β -Stellungen mit Aceton besetzt ist, verhält sich zu Nieren- und Taka-Phosphatase wie α -Glycerophosphorsäure.

Die Veresterungsstelle der Phosphorsäure an Glycerin hat darum einen auffallenden Unterschied bei der enzymatischen Hydrolyse hervorgebracht. Da der Versuch mit dem Acetonglycerophosphat so betrachtet wurde, dass die nicht phosphorylierten OH-Gruppen des Glycerinrests dabei keine Rolle spielen dürfen, musste die Ursache in der Natur der veresterten OH-Gruppe des Glycerins aufgesucht werden. Bei dem α -Glycerophosphat war die betreffende OH-Gruppe in der Form von Primäralkohol, dagegen bei dem β -Ester in der Form von Sekundäralkohol vorhanden. Die Entscheidung wurde folglich mit dem einfacheren Phosphorsäureester ausgeführt.

Die für diesen Zweck ausgesuchten Substrate waren Propyl- (III) und Isopropylphosphorsäureester (IV). Diese beiden Ester der 3 C-atomigen isomeren Alkohole wurden von Nierenphosphatase, wie Glycerophosphat, unter den Bedingungen der Versuche bei Ph 9 optimal, aber von der Taka-Phosphatase ganz eigentümlich gespalten. Die optimale Acidität war bei der Propylphosphat-spaltung Ph 5,5, wie bei α -Glycerophosphat. Bei der Isopropyl-

phosphatspaltung war sie Ph 3,1, wie bei β -Glycerophosphat.

Man weiss also nun, dass ein Phosphorsäureester, dessen chemische Konstitution sehr einfach genannt werden muss, von zwei ganz ausgeprägt differenten Fermenten gespalten wird, dass die Phosphorsäure nach der Veresterungsstelle an dem mehrwertigen Alkohol ganz verschiedenartig von einem Ferment angegriffen wird, und dass die Differenz überhaupt von der Form des phosphorierten Alkoholrests, primär oder sekundär, verursacht wird.

Es ist auch interessant, hier das Resultat des Versuches mit der Glykolphosphorsäure (V) zu erwähnen. In diesem Alkoholrest sind die zwei OH in der Form von primärem Alkohol vorhanden. Der betreffende Phosphorsäureester kann aber, wie aus der Konstitutionsformel ersichtlich, so angenommen werden, dass eine $-\text{CH}_2\text{-OH}$ Gruppe der α - oder β -Glycerophosphorsäure durch ein Wasserstoffatom ersetzt wurde. Das Experiment ergab, wie die Regel erfordert, dass die Glykolphosphorsäure sich in derselben Weise verhält, wie α -Glycerophosphorsäure. Diese Regel, die das Verhältnis zwischen der Spaltbarkeit des Phosphorsäureesters und der chemischen Struktur des Alkoholrests bedngt, kommt nicht zur Geltung, wenn ein aromatischer Kern den Wasserstoff des Alkyls substituiert.

Benzylphosphorsäure (VI) und β -Phenäthylphosphorsäure (VII) wurden von Nierenphosphatase, als die Konzentration des Substrats M/1000 war, bei Ph 9,4 resp. 9,0 optimal gespalten, aber von Taka-Phosphatase, wie es bei der β -Glycerophosphorsäure der Fall war, bei Ph 3 optimal hydrolysiert.

Die Substitution mit der Phenylgruppe hat den aliphatischen primären Alkohol derartig verändert, dass er sich nun zu dem Ferment genau so verhält, wie ein sekundärer Alkohol.

Man hat jedenfalls zwei Arten Phosphorsäureester, die nach der chemischen Natur des Alkoholrests von der Taka-Phosphatase bald bei Ph 3, bald bei Ph 5,6 optimal angegriffen werden.

Phenyl(VIII) und Kresyl-Monophosphorsäure (IX) ver-

halten sich zu den Phosphatasen wie β -Glycero- und Benzylphosphorsäure. Sie sind optimal spaltbar von dem Nierenferment bei Ph 9,9 und von dem Takaferment bei Ph 3. Die Steigerung der Konzentration des Substrats auf M/25 hat bei Nierenferment das Optimum, wie erwartet, bis Ph 10,3 verschoben.

Die optimale Hydrolyse der Phosphorsäureester durch die Nieren-Phosphatase in der endlichen Konzentration des Substrats von M/1000 wurde nicht in derselben Acidität ausgeführt: Phenyl- und Kresyl-phosphorsäure bei Ph 9,9, Benzylphosphorsäure bei Ph 9,4 und Phenäthylphosphorsäure und die übrigen bei Ph 9. Wie aus dem experimentellen Teil ersichtlich, waren die erstgenannten Ester am raschesten spaltbar, und demnächst folgte der Benzylester. In der vorigen Mitteilung hat der Verfasser aber dazu bemerkt, dass das Optimum der β -Glycerophosphathydrolyse nach der Steigerung der Substratskonzentration zu dem grösseren Ph verschoben werden kann, und hat eine Ursache in der Schutzwirkung des Substrats gegen die Alkali Inaktivierung des Ferments erkannt. Wenn aber die Substrate andererseits überhaupt fermentativ rasch hydrolysierbar sind, kann es vorkommen, dass die Inaktivierung durch die gesteigerte Alkalizität nicht hinreicht, die Aktivitätszunahme der Phosphatase zu unterdrücken. Damit ist es verständlich, dass, je leichter hydrolysierbar die Phosphorsäureester sind, desto mehr ihr Optimum auf der erhöhten alkalischen Reaktion beruht.

Wenn man an den am Benzolkern hydroxylierten Kohlenwasserstoffen die Struktur der tertiären Alkohole betrachten will, so führt das Verhältnis bei den Phenyl- und Kresyl-Phosphorsäuren zu dem Schluss, dass sich die phosphorylierten sekundären und tertiären Alkohole enzymatisch in gleicher Weise verhalten. Aber die endgültige Entscheidung muss mit dem Ester des aliphatischen Alkohols getroffen werden. Und wie die hydroaromatischen Alkohole nach der Phosphorierung zu der fermentativen Spaltung sich verhalten, ist auch vom Interesse. Untersuchungen darüber sind am hiesigen Institut im Gange.

Die bisher untersuchten Monoester erfuhren alle ihre optimale Spaltung durch die Nierenphosphatase bei Ph 9–10. Als der Verfasser von dem Monoester zu dem Diester der Orthophosphorsäure überging, fand er ein anderes Verhalten zu den Phosphatasen.

Diphenyl-Monophosphorsäure (X) wurde von Taka-Ferment optimal bei Ph 5,6, aber ganz auffallender Weise von Nierenferment bei Ph 7,7 optimal hydrolysiert. Hier war also eine ausgeprägte Verschiedenheit zwischen Mono- und Di-ester der Phosphorsäure vorhanden. Ich habe zuerst die Darstellung des Phosphorsäure-Monophenylesters nach Iwatsuru (1926) versucht. Das erworbene Kalisalz kristallisierte schön in Blättchen. Aber da es eine grosse Menge Diphenylphosphorsaures Kalium enthielt, mussten die Mono- und Di-Phenylester gesondert als Chloride fraktioniert und dann in die entsprechenden Säuren übergeführt werden.

Das eigentümliche Verhalten des Di-Esters der Phosphorsäure wurde auch bei der Diglycerophosphorsäure (XI) und Diäthylphosphorsäure (XII) festgestellt.

Die Di-Ester der Phosphorsäure sind überhaupt schwerer hydrolysierbar als die entsprechenden Monoester. Die optimale Spaltung der Di-Ester durch das Nierenferment bei Ph 7,7 könnte eventuell dadurch verursacht werden, dass die Inaktivierung durch Alkalizität bei einem solchen zeitlich verlängerten Versuche überhand nehme, und dass die Phosphatase schliesslich bei einer verhältnismässig schwach alkalischen Reaktion ihre günstigste Bedingung gefunden habe. Es war aber nicht der Fall. Die gepufferte Fermentlösung wurde bei Ph 7,7 und 9,0 über Nacht in den Brutschrank von 37°C gestellt und dann mit Glycerophosphat versetzt. Die Konzentration der Ferment- und Substratlösungen war wie bei den sonstigen Versuchen. Aber die Phosphorsäureabspaltung fand in weit grösserer Masse bei Ph 9 als bei Ph 7,7 statt. Die Steigerung der endlichen Konzentration des Di-Esters auf M/25 und die Verkürzung der Versuchszeit hatten auch keine Verschiebung des Optimums herbeigeführt. Es musste also das Optimum der Hydrolyse des Di-Esters bei Nieren-

phosphatase als Ph 7,7 bezeichnet werden.

Eine Beziehung der Wirkung des Ferments zu der chemischen Konstitution des Substrats ist schon seit früherer Zeit anerkannt. Aber eine solche Regelmässigkeit, wie sie hier gefunden worden ist, ist doch als sehr merkwürdig zu erwähnen. Die zusammengefassten Ergebnisse sind unten tabellarisch aufgezeichnet.

		Ph-Optimum bei	
		Taka-Phosphatase	Nierenphosphatase
I.	β -Glycerophosphorsäure	3,1	9,0
	Isopropylphosphorsäure	"	"
	Phenäthylphosphorsäure	"	"
	Benzylphosphorsäure	"	9,4
	Phenylphosphorsäure	"	9,9
	Kresylphosphorsäure	"	"
II.	α -Glycerophosphorsäure	5,5	9,0
	Acetonglycerophosphorsäure	"	"
	Glykolphosphorsäure	"	"
	Äthylphosphorsäure	"	"
	Propylphosphorsäure	"	"
III.	Diphenylphosphorsäure	5,5	7,8
	Dikresylphosphorsäure	"	"
	Diglycerophosphorsäure	"	"
	Diäthylphosphorsäure	"	"

Bei dem Versuch mit β -Glycerophosphat wollten wir annehmen, dass die Ph-Abhängigkeit der Phosphatase mit dem Dissoziationszustand des Substrats gar nichts zu tun habe. Pk dieses Monoesters bei der zweitstufigen Dissoziation ist 6,11 (Kobayashi, 1926) oder 6,31 (Meyerhof, 1926). Pk bei der erststufigen Dissoziation ist 1,4 nach Meyerhof. Die aus dem schönen Verlauf der Ph-Aktivitätskurve bei dem β -Glycerophosphat erworbenen Dissoziationskonstanten, nämlich Pk 4,8 bei Taka-Phosphatase und

Pk 9.2 bei Nierenphosphatase, liessen uns ohne weiteres irgendeinen Zusammenhang der Ph-Abhängigkeit mit der Dissoziation des Substrats ausschliessen.

Aber als wir diese zwei Phosphatasen auf andere Substrate einwirken liessen und einen innigen Zusammenhang zwischen der Lage des Ph-Optimums und der chemischen Konstitution der Substrate fanden, kamen wir in die Lage, einen anderen Faktor als die Dissoziation der Fermente in Erwägung ziehen zu müssen. Dies um so mehr, als die Spaltung des α -Glycerophosphats bei Ph 5.6 durch Taka-Phosphatase wohl fast in gleichem Betrag wie bei β -Glycerophosphat stattfindet, aber bei Zunahme der Acidität sich immer mehr vermindert, während die des β -Glycerophosphats dabei noch vergrössert wird, bis die Acidität Ph 3 erreicht ist.

Wir wollen also den Dissoziationsgrad des Ferments und gleichzeitig des Substrats in den Gedankengang einführen. Mit demselben Problem hat sich Northrop beschäftigt und kürzlich (1928) angegeben, dass diese beiden Faktoren bei der ereptischen Spaltung der Dipeptide die Lage des Optimums bestimmen. Er hat dabei Pk des Ferments aus der optimalen Acidität und Dissoziationskonstante des Substrats ausgerechnet und aus der übereinstimmenden Zahl der Pk-Werte die Gültigkeit der Theorie gefolgert.

Bei den Phosphatasen wollen wir nun annehmen, dass die dissoziierten Ionen der Substrate und die undissoziierten Fermentmoleküle reagieren oder, dass die undissoziierten Substratsmoleküle und die dissoziierten Fermentationen wirken. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Reaktionsgeschwindigkeit (V) dem Produkte der Konzentrationen der reagierenden Agenzien proportional. Wir bezeichnen mit

- [S].....die gesamte Konzentration des Substrats,
- [S⁻].....die Konzentration des Substratsanions,
- [S_u].....die Konzentration des undissoziierten Substrats,
- [F].....die gesamte Konzentration des Ferments,
- [F⁻].....die Konzentration des Fermentsanions, und

$[F_u]$ die Konzentration der undissoziierten Fermentsmoleküle.

Daraus folgt

$$V = k [F^-] \cdot [S_u] \quad \text{..... (1)}$$

$$\text{oder } V = k [F_u] \cdot [S^-] \quad \text{..... (2)}$$

Das Massenwirkungsgesetz fordert

$$\frac{[S^-] \cdot [H^+]}{[S] - [S^-]} = K_s, \quad [S^-] = \frac{K_s \cdot [S]}{K_s + [H^+]}, \quad [S_u] = \frac{[H^+] \cdot [S]}{K_s + [H^+]}$$

und $\frac{[F^-] \cdot [H^+]}{[F] - [F^-]} = K_f, \quad [F^-] = \frac{K_f \cdot [F]}{K_f + [H^+]}, \quad [F_u] = \frac{[H^+] \cdot [F]}{K_f + [H^+]}$.

Im Fall der Gleichung (1) ist

$$V = k \cdot \frac{[H^+] \cdot [F] \cdot K_s \cdot [S]}{(K_f + [H^+]) (K_s + [H^+])}.$$

Wenn die gesamte Konzentration des Substrats und Ferments konstant ist, wird die Reaktionsgeschwindigkeit von der Wasserstoffzahl bestimmt. Die maximale Geschwindigkeit wird erhalten,

wenn $\frac{[H^+]}{(K_f + [H^+]) (K_s + [H^+])}$ maximal ist, d. i. wenn das Reziprokal minimal ist.

Daraus folgt

$$\frac{d \left(\frac{K_f}{[H^+]} + 1 \right) (K_s + [H^+])}{d [H^+]} = - \frac{K_f \cdot K_s}{[H^+]^2} - \frac{K_f}{[H^+]} + \frac{K_f}{[H^+]} + 1 = 0$$

$$\therefore \frac{K_f \cdot K_s}{[H^+]^2} = 1, \quad [H^+] = \sqrt{K_f \cdot K_s} \quad \text{und} \quad Ph = \frac{P_{K_f} + P_{K_s}}{2} \quad \text{..... (3)}$$

Im Fall der Gleichung (2) wird das Maximum von V in derselben Weise erhalten, wie Ph der Durchschnitt des P_{K_f} und P_{K_s} ist.

Taka-Phosphatase ist ein Ampholyt, und das undissoziierte Molekül wirksam. P_{K_a} ist 4.8. Von P_{K_b} wissen wir vorläufig nichts. Nach Meyerhof ist P_k der β -Glycerophosphorsäure 1.4. Die optimale Acidität soll nach der Gleichung (3) Ph 3,1 sein, wie

wir bei dem Experiment wirklich gesehen haben. Daraus folgt dann, dass die Taka-Phosphatase in dem undissoziierten Zustand mit dem Ion der β -Glycerophosphorsäure oder des mit ihr zu derselben Gruppe gehörenden Esters in der ersten Dissoziationsstufe reagiert. Da an der weniger sauren Seite des Ph-Optimums die erststufige Dissoziation der Ester praktisch vollständig ist, wird die Ph-Aktivitätskurve an dieser Zone von dem Substrat nicht beeinflusst. Dies war auch der Fall. An der sauren Seite des Optimums fällt die Kurve ziemlich steil ab, wie Inouye untersucht hat. Dies kann vielleicht damit erklärt werden, dass die Konzentration des undissoziierten Fermentampholyten und des undissoziierten Esters gleichzeitig abnimmt. Inouye hat das Optimum bei Ph 2,8 gefunden. Aber dabei war die Konzentration des Substrats ziemlich hoch, und der Dissoziationsgrad des Substrats soll nur einen geringen Einfluss ausgeübt haben. Der Verfasser hat später wiederholt das Optimum bei Ph 3,1–3,2 festgestellt, wobei die Konzentration des Substrats M/1000 war.

Wir kommen nun zu der II. Gruppe des Monoesters, der α -Glycerophosphorsäure und den anderen, die von der Taka-Phosphatase bei Ph 5,6 optimal gespalten werden. Wir nehmen hier an, dass die undissoziierten Fermentmoleküle mit dem auf der zweiten Stufe dissoziierten Phosphorsäureester reagieren. Diese Annahme stimmt mit dem Resultat des Experiments gut überein. Die zweite Dissoziationskonstante der Glykolphosphorsäure wurde vom Verfasser als $P_k = 6,3$ ermittelt. P_k der Taka-Phosphatase ist 4,8. Das berechnete Ph-Optimum ist 5,55 und das experimentell gemessene war 5,5. Die Propylphosphorsäure hat P_k 6,5. Das berechnete Ph-Optimum ist 5,6 und das gemessene war 5,5.

Nierenphosphatase hat P_k von 9,2. Wie oben erwähnt, wirkte dieses Ferment auf die Monoester der Phosphorsäure bei Ph 9–10 optimal. Dies ist aber nicht das eigentliche Optimum, weil die Inaktivierung durch die Alkalizität an der alkalischen Seite des Optimums steigend stärker hervortritt. Diese Inaktivierung kann aber, wie es der Verfasser untersucht hat, durch die Steigerung der

Konzentration des Substrats mehr oder weniger gehemmt werden, und das Ph-Optimum wird darum zu der stärker alkalischen Reaktion verschoben. Der aus der experimentell erhaltenen Kurve gemessene Pk-Wert ist, wie erwähnt, 9,2.

Wir nehmen an, dass die Monoester der Phosphorsäure überhaupt in dem total dissoziierten Zustand mit dem Ferment reagieren. Im Bereich der Dissoziationskurve der Nierenphosphatase sind solche Ester total ionisiert, darum deckt sich die Ph-Aktivitätskurve dieser Phosphatase in Bezug auf jene Ester praktisch mit der Dissoziationskurve des Ferments.

Bei der dritten Gruppe der Phosphorsäureester, nämlich bei den Di-Estern ist das Verhältnis ganz anders. Die Diphenylphosphorsäure ist eine einbasische Säure, und ihre wässrige Lösung reagiert stark sauer gegen Congorot. Die Dissoziationskonstante war schwer zu bestimmen, aber annäherungsweise als in der Ordnung von 10^{-1} anzugeben. Solche Säure ist in dem Wirkungsbereich der Phosphatasen, pflanzlich oder tierisch, im total dissoziierten Zustand vorhanden. Die theoretische Berechnung des Optimums scheint aber kaum ausführbar. Aber wenn wir statt des Di-Esters den entsprechenden Monoester im elektrochemischen Sinne in Erwägung ziehen wollen, stimmt die Rechnung gut mit dem experimentellen Resultat überein. Die zweite Dissoziationskonstante der Monophenylphosphorsäure war Pk 6,12. Das berechnete Optimum ist bei Takaferment also Ph 5,5 und bei Nierenferment Ph 7,8. Bei der Di-Glycerophosphorsäure war dies auch der Fall. Die Übereinstimmung ist zu genau, um sie als zufällig zu betrachten. Unter dem Vorbehalt der vorläufigen Annahme, bis noch bei anderen Fermenten eine Analogie gefunden wird, kann man doch sagen, dass die elektrochemische Natur des Phosphorsäurediesters in ihrer Fermentkinetik von der des darin enthaltenen Monoesters bedingt wird.

Wir haben bisher die Nierenphosphatase als Säure behandelt. Wenn wir dieses Ferment als Base annehmen, ist $\text{Pk } 14 - 9,2 = 4,8$. Bei den Monoestern der Phosphorsäure reagiert das undissoziierte

Ferment mit dem total dissoziierten Substrat. Bei den Diestern ist der Dissoziationsgrad des darin chemisch gebundenen Monoesters massgebend. Die Berechnung kann einfach ausgeführt werden und die Lage des Optimums wird nicht verändert.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNGEN.

Die Fermentlösung, die zu solchen Versuchen gebraucht wird, muss möglichst frei sein einerseits von irgendeinem Stoff, der die Geschwindigkeit der Fermentreaktion beeinflusst, und andererseits von Phosphor, sowohl von anorganischer Phosphorsäure als auch von dem enzymatisch spaltbaren Phosphorsäureester. Dieser Forderung entsprachen die gereinigte Taka-Phosphatase nach Kobayashi-Inouye (1927, 1928) und die Nierenphosphatase nach dem Verfasser (1928).

II. DARSTELLUNG DER PHOSPHORSÄUREESTER.

A. *α-Glycerophosphorsäure.*

α-Glycerophosphorsäure wurde nach der Angabe von Zetzsche und Äschlimann (1926) als Bariumsalz dargestellt. *α*-Chlorhydrin wurde zuerst in Glycid verändert, und dieses wurde mit sirupöser Phosphorsäure behandelt. Bei der Analyse wurde das Bariumsalz bei 100°C unter vermindertem Druck über P_2O_5 getrocknet. 0,53240 g davon wurden im Messkolben in 100 ccm Wasser gelöst. In den aliquoten Teilen wurde Barium als Sulfat gravimetrisch und Phosphor nach Briggs kolorimetrisch analysiert.

$C_3H_7O_6P\text{Ba}$ (307,466) berechnet: P 10.1%, Ba 44.7%
 gefunden: P 10.15%, Ba 44.3%

B. *Acetonglycerophosphorsäure.*

Acetonglycerophosphorsäure wurde nach Fischer und Pfähler (1920) durch Phosphorierung des Acetonglycerins in

Chinolin mit POCl_3 als gut kristallisierbares Bariumsalz dargestellt. 0.59075 g des scharf getrockneten Salzes wurde wie oben analysiert.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6\text{PBa}$ (347.498) berechnet: P 8.95%, Ba 39.5%
 gefunden: P 8.86%, Ba 39.1%

C. Glykolphosphorsäure.

Glykolphosphorsäure wurde nach Carré (1905) dargestellt. Äquivalente Menge von Glykol und 98%iger phosphorsäure wurde am Rückflusskühler im Ölbad von 140–145°C bei 15–18 mm Druck 10 Stunden erhitzt. Der Kolbeninhalt wurde nach Abkühlung in Wasser gelöst und 1 Stunde gekocht, um die beigemischte Diglykolphosphorsäure in Monoester überzuführen. Die abgekühlte Lösung wurde mit Bariumcarbonat im Überschuss versetzt und filtriert. Da die Erlangung des Bariumsalzes der Glykolmonophosphorsäure durch Erhitzung des Filtrats nicht gelang, wurde dieses mit Alkohol bis zur Trübung versetzt, und die ausgeschiedenen Kristalle wurden getrocknet und analysiert. Die Produkte erwiesen sich aber als Gemisch der Mono- und Diglykol-Phosphorsäure in ihrem Bariumsalz. Daher wurden sie wieder in Wasser gelöst und mit der ausgerechneten ungenügenden Menge von Baryt versetzt und gekocht. Eine leichte Trübung wurde durch Wasserzusatz gelöst, und eine Spur von Baryt durch CO_2 entfernt. Aus der konzentrierten Lösung konnte das Barium-Glykolmonophosphat durch Alkoholversatz ausgefällt werden. 0.61414 g des über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrockneten Salzes verloren bei 100°C unter vermindertem Druck (15 mm) über P_2O_5 0.05397 g Wasser. Das kristallwasserfreie Salz wurde wie oben analysiert.

$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_5\text{P Ba} \cdot 1\frac{1}{2}$ Wasser berechnet: Kristallwasser 1.5 Mol
 gefunden: 1.47 Mol

$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_5\text{P Ba}$ (277.45) berechnet: P 11.18%, Ba 49.7%
 gefunden: P 11.07%, Ba 49.9%

D. Propylphosphorsäure.

Propylphosphorsäure wurde wie folgt dargestellt: 9 g Propylalkohol wurden mit dem Gemisch von 5 g kristallisierter Phosphorsäure (98%) und 7 g Phosphorpentoxyd versetzt. Die von selbst heiss gewordene Reaktionsmasse wurde, nachdem sie bei Zimmertemperatur bis zum Abkühlen stehen gelassen war, in 300 ccm Wasser gelöst und mit fein pulverisiertem Baryt bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und von dem überschüssigen Baryt durch Kohlensäure befreit. Als das klare Filtrat auf dem siedenden Wasserbad konzentriert wurde, schwebte eine amorphe Masse an der Oberfläche der Lösung. Sie wurde abfiltriert, und bei weiterer Konzentration schieden sich reichliche Kristalle aus, die auf dem Heisstrichter gesammelt wurden.

0.61325 g des über CaCl_2 bei Zimmertemperatur getrockneten Salzes wog 0.54267 g nach dem Trocknen bei 100°C über P_2O_5 unter vermindertem Druck. Gewichtsverlust 0.07058 g.

$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PBa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	berechnet:	Kristallwasser	2 Mol
	gefunden:	„	1.98 Mol
$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PBa}$ (275.466)	berechnet:	P	11.26%, Ba 50.1%
	gefunden:	P	11.33%, Ba 49.5%

E. Isopropylphosphorsäure.

Isopropylphosphorsäure wurde als Bariumsalz in der gleichen Weise dargestellt, wie Lossen und Köhler (1891) bei der Monoäthylphosphorsäuresynthese ausgegangen sind. 0.64876 g des über CaCl_2 aufbewahrten Bariumsalzes verloren bei 100°C über P_2O_5 unter vermindertem Druck 0.07574 g Wasser. 0.57302 g des kristallwasserfreien Salzes dienten zur Analyse.

$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PBa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	gefunden:	Kristallwasser	2.02 Mol.
$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PBa}$ (275.466)	berechnet:	P	11.26%, Ba 50.1%
	gefunden:	P	11.19%, Ba 50.23%

F. β -Phenäthylphosphorsäure.

β -Phenäthylphosphorsäure konnte als Kaliumsalz auf folgende

Weise dargestellt werden: 15 g POCl_3 wurden mit Phenyläthylalkohol zusammengebracht und auf dem Sandbad bis zum Aufhören der Salzsäuregasentwicklung erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde, um dem überschüssigen POCl_3 zu beseitigen, zuerst unter Kühlung mit Kältemischung mit Eiswasser versetzt, und dann unter starker Umrührung 35 g K_2CO_3 in 30 ccm Wasser zugesetzt. Der nicht reagiert habende Phenyläthylalkohol wurde im Scheidentrichter mit Äther ausgezogen. Die wässrige Lösung wurde auf dem siedenden Wasserbad eingeeengt. Eine anfangs ausgeschiedene kristalloide Substanz wurde abfiltriert, da sie sich analytisch als nicht erforderlich erwies. Das Filtrat wurde weiter eingedampft, und der Rückstand wurde mit heissem Alkohol ausgezogen. Die nach dem Eindampfen des Extrakts verbliebene Masse wurde wieder mit Absolutalkohol bei Zimmertemperatur extrahiert. Aus der bis zur Trübung mit Äther versetzten alkoholischen Lösung schied sich das Kalium Phenäthylphosphat im Laufe von 24 Stunden in kleinen nadeligen Kristallen aus. Ausbeute 7 g. 0.53447 g des in Exsikator über H_2SO_4 aufbewahrten Salzes wogen nach dem Trocknen über P_2O_5 bei 100°C unter vermindertem Druck 0.50152 g. Der Gewichtsverlust war 0.03295 g. Am getrockneten Salz wurde der Phosphorgehalt gemessen.

$\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4\text{PK}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ gefunden: Kristallwasser 1.01 Mol

$\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4\text{PK}_2$ (278.312) berechnet: P 11.15%

gefunden: P 11.08%

G. Benzylphosphorsäure.

Benzylphosphorsäure wurde schon von Zetzsehe und Nachmann (1925) dargestellt. Der Verfasser hat zuerst nach den Angaben der erwähnten Autoren die Synthese zu wiederholten Malen versucht, ohne ein gutes Resultat erzielen zu können. Infolgedessen versuchte er eine abgeänderte Methode.

Äquivalente Mengen von Benzylchlorid (M/10) und 98% iger Phosphorsäure (M/10) wurden unter Kühlung in Eiswasser portionsweise mit frisch hergestelltem Silberoxyd (M/20) durch-

gemischt. Nach kurzer Erwärmung im Wasserbad wurde das teigige Gemenge mit Äther umgerührt und mit einer gesättigten Kaliumcarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Die von dem Silberchlorid abfiltrierte wässrige Lösung wurde dann auf dem siedenden Wasserbad eingedampft, und der Rückstand mit heissem Absolutalkohol extrahiert. Das Kalium Benzylphosphat schied sich aus dem Auszug nach Ätherzusatz in 24 Stunden als kleine nadelige Kristalle aus. 0.45249 g des im Exsikator aufbewahrten Salzes verloren 0.02869 g Kristallwasser beim Trocknen über P_2O_5 bei $100^\circ C$ unter vermindertem Druck. 0.4238 g des getrockneten Salzes dienten zur Analyse.

$C_7H_7O_4PK_2 \cdot 1 H_2O$ gefunden: Kristallwasser 0.993 Mol

$C_7H_7O_4PK_2$ (264.296) berechnet: P 11.76%

gefunden: P 11.72%

H. Phenylphosphorsäure

Die Synthese der Phenylphosphorsäure wurde zuerst nach Iwatsuru (1926) vorgenommen. Der Verfasser konnte auch das Reaktionsprodukt als schöne blättchenförmige Kristalle bekommen. Aber da das beigemengte Kaliumdiphenylphosphat trotz wiederholter Darstellungen und Umkristallisation schwer abtrennbar war, wurde eine andere, aber umständliche Methode ausgearbeitet. Sie kann als ein kombiniertes Verfahren nach den Jacobsonsen (1875) und Rappschen (1884) Methoden angesehen werden.

160 g $POCl_3$ wurden in Rundkolben portionsweise unter Schüttelung mit 94 g Phenol versetzt und auf dem Sandbad am Rückflusskühler bis zum Aufhören der Salzsäuregasentwicklung 10–12 Stunden erhitzt. Der hellgelbliche Inhalt wurde dann destilliert, und die bei 230° – $255^\circ C$ übergehende Fraktion wurde gesammelt und in 400 ccm warmes (50°) Wasser unter starker Umrührung in kleinen Portionen eingegossen. Dabei wurde das Monophenylphosphoroxydichlorid zur Monophenylphosphorsäure hydrolysiert, die in Lösung überging. Das in kleiner Menge beigemischt vorhandene Diphenylphosphoroxychlorid, welches unter

solchen Bedingungen schwer zu spalten war, und die eventuell dabei entstandene Diphenylphosphorsäure blieben aber als ölige Masse am Boden. Nach einer Stunde wurde die wässrige Lösung im Wasserbad von 40°C unter vermindertem Druck eingeeengt und dann mit Äther durchgeschüttelt. Die Extraktion wurde wiederholt. Beim Eindampfen des gesamten Auszugs kristallisierte die Phenylphosphorsäure in kleinen Nadeln, die aus Chloroform umkristallisiert werden konnten. Schmelzpunkt 98°C. 1.04573 g der bei 56°C unter vermindertem Druck getrockneten Substanz wurden analysiert.

$C_6H_7O_4P$ (174.096) berechnet: P 17.82%

gefunden: P 17.90%

10 cem M/10 Lösung der Säure wurde mit 15 cem M/10 NaOH versetzt. Ph 6.12. Die zweite Dissoziationskonstante ist also als Pk ausgedrückt 6.12. Die Phenylphosphorsäure konnte auch in das gut kristallisierende Natriumsalz übergeführt werden. Die wässrige Lösung wurde mit Natronlauge bis zur schwach Rosarotfärbung des Phenolphthaleins neutralisiert und mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Das Salz schied sich in kleinen Nadeln aus. Diese wurden mit absolutem Alkohol, dann mit Äther gewaschen und getrocknet. Ein Molekül Kristallwasser. Die kristallwasserfreie Substanz zeigte die folgende Analyse:

$C_6H_5PO_4Na_2$ (218.08) berechnet: P 14.2%

gefunden: P 14.28%

I. *o*-Kresylphosphorsäure.

o-Kresylphosphorsäure wurde wie Phenylphosphorsäure dargestellt. Der Schmelzpunkt der bei 56°C unter vermindertem Druck getrockneten Säure war 95°C. Pk 6.09.

$C_7H_9O_4P$ (188.11) berechnet: P 16.5%

gefunden: P 16.8%

J. *Diphenylphosphorsäure.*

120 g $POCl_3$ und 140 g Phenol wurden, wie bei der Darstellung

der Monophenylphosphorsäure, behandelt. Die bis 270°C unter gewöhnlichem Druck siedende Fraktion wurde abdestilliert. Der zurückbleibende Sirup wurde in Portionen mit Wasser von 50°C versetzt und bei Zimmertemperatur 1–2 Stunden stehen gelassen, um das noch etwas gemengte Monophenylphosphoroxychlorid in die wasserlösliche Säure überzuführen. Die untere ölige Schicht wurde mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und dann mit gesättigtem Kaliumcarbonat versetzt, bis die Lösung schwach alkalisch reagierte.

Dabei schied sich Triphenylphosphorsäureester kristallinisch aus. Die davon abfiltrierte wässrige Lösung wurde auf dem Wasserbad eingedampft und abgekühlt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden scharf abgesaugt, in absolutem Alkohol gelöst und mit Äther versetzt. Diphenylphosphorsaures Kalium schied sich in blätterförmigen Kristallen aus. Ausbeute 70%. Das Kaliumsalz enthält 2 Molekül Kristallwasser, das über P_2O_5 bei 100°C unter vermindertem Druck befreit wird. Die Analyse gab: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{PO}_4\text{K}$ (306,24).

berechnet: P 10.13%

gefunden: P 10.35%

K. Diglycerophosphorsäure.

Diese Säure wurde von Inouye im hiesigen Institut nach Tutin und Hann (1906) als Calciumsalz dargestellt. Aus Wasser kristallisierte es in länglichen Nadeln aus. Schmelzpunkt 249°C .

L. Diäthylphosphorsäure.

Diese Säure wurde nach Cavalier (1898) von Inouye dargestellt. Ich spreche Herrn Inouye meinen besten Dank für die freundliche Überlassung der Präparate aus.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

M/200 der Substratlösungen wurden hergestellt. Bei dem

Bariumsalz wurde eine abgewogene Menge in Wasser gelöst, mit dem berechneten Kaliumsulfat versetzt, auf das bestimmte Volumen mit Wasser verdünnt und von dem Bariumsulfat abfiltriert. Pufferlösung war Acetat-Essigsäure (M/2), Glykokoll-Natron (M/10) oder Borax-Borsäuremischung nach Palitzsch (1915). Versuchslösung bestand aus:

M/200	Substratlösung	5.0 ccm
	Puffer	5.0 ccm
	Wasser	10.0 ccm
	Fermentlösung	5.0 ccm

Die endliche Konzentration des Substrats war also M/1000.

Die abgespaltete anorganische Phosphorsäure wurde nach Briggs kolorimetrisch ermittelt. Die in den folgenden Protokollen angegebene Zahl bedeutet die Phosphorsäure als P in mg in 1 ccm der Versuchslösung. Wenn die Konzentration des Substrats gesteigert werden sollte, wurde eine Lösung von M/10 hergestellt. Die Versuchslösung war dabei wie folgt:

M/10	Substratlösung	10.0 ccm
	Puffer	10.0 ccm
	Fermentlösung	5.0 ccm

Da die vorliegenden Versuche schrittweise mit der jeweiligen Darstellung der Substrate ausgeführt wurden, musste der Verfasser die Fermentlösungen dazwischen neu nach derselben Methode herstellen. Der Fermentgehalt war fast gleich, doch wurde in den Protokollen die Fermentlösung mit (A) oder (B) angemerkt. Wenn die Phosphorabspaltung sehr schnell fortgeschritten war, wurde die Fermentlösung vorher verdünnt. $\frac{1}{2}$ Fermentlösung bedeutet 2 fach verdünnt.

IV. VERSUCHE.

I. *Takaphosphatase.*

A. β -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (A).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
3.17	0.0160	0.0234	0.0310
5.58	0.0090	0.0140	0.0198

B. β -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
3.21	0.0132	0.0212	0.0302
5.52	0.0081	0.0128	0.0185

C. α -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (A).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
2.89	0.0045	0.0061	0.0067
3.63	0.0054	0.0067	0.0098
4.54	0.0064	0.0089	0.0120
5.16	0.0084	0.0110	0.0155
5.54	0.0088	0.0128	0.0196
5.78	0.0085	0.0112	0.0160
6.28	0.0068	0.0067	—

D. Acetonglycerophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (A).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
3.10	0.0057	0.0061	0.0072
4.58	0.0074	0.0108	0.0123
5.55	0.0094	0.0154	0.0197

E. Glykolphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
3.18	0.0034	0.0044	0.0053
5.54	0.0052	0.0067	0.0077

F. Propylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
3.50	0.0057	0.0094	0.0142
5.34	0.0084	0.0132	0.0175
5.53	0.0088	0.0137	0.0177
5.70	0.0084	0.0130	0.0173

G. Isopropylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	2 St.
3.12	0.0077	0.0184
3.95	0.0070	0.0165
5.34	0.0051	0.0132

H. β -Phenäthylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (A).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.28	0.0119	0.0185	0.0314
4.32	0.0110	0.0168	0.0280
5.55	0.0103	0.0140	0.0235
5.77	0.0078	0.0122	0.0203

I. Benzylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.16	0.0085	0.0135	0.0190
4.61	0.0070	0.0104	0.0164
5.50	0.0061	0.0090	0.0145

J. Phenylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	2 St.
3.12	0.0204	0.0263	0.0298
4.58	0.0143	0.0211	0.0263
5.58	0.0082	0.0162	0.0223

K. *o*-Kresylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	2 St.
3.23	0.0184	0.0255	0.0291
4.41	0.0138	0.0201	0.0254
5.62	0.0092	0.0153	0.0212

L. Diphenylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
3.12	0.0051	0.0059
4.60	0.0062	0.0085
5.52	0.0077	0.0118
6.32	0.0056	0.0081

M. Di-*o*-Kresylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
3.10	0.0058	0.0061
4.60	0.0065	0.0088
5.54	0.0088	0.0120
6.45	0.0061	0.0083

N. Di- β -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	3½ St.
3.21	0.0069
4.62	0.0083
5.52	0.0118

O. Diäthylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (B).

Ph \ Zeit	3½ St.
3.24	0.0218
4.62	0.0282
5.54	0.0304

II. Nierenphosphatase.

A. β -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Nierenphosphatase (A).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
9.05	0.0231	0.0290	0.0310

B. β -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Nierenphosphatase (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
9.03	0.0178	0.0248	0.0310

C. α -Glycerophosphorsäure (M/1000) + Nierenphosphatase (A).

Ph \ Zeit °	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
7.20	0.0035	0.0060	0.0120
8.49	0.0134	0.0202	0.0240
8.89	0.0165	0.0218	0.0246
8.98	0.0179	0.0231	0.0250
9.17	0.0155	0.0228	0.0244
9.54	0.0135	0.0204	0.0236
9.98	0.0083	0.0160	0.0218

D. Azetonglycerophosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (A).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
7.58	0.0056	0.0120	0.0229
8.85	0.0252	0.0305	0.0318
9.04	0.0257	0.0307	0.0320
9.30	0.0233	0.0285	0.0290

E. Glykolphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
8.40	0.0114	0.0151	0.0216
9.05	0.0127	0.0167	0.0220
9.36	0.0116	0.0152	0.0210

F. Propylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
8.35	0.0078	0.0132
8.95	0.0102	0.0152
9.21	0.0085	0.0131

G. Isopropylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	1 St.	2 St.
8.51	0.0068	0.0120
9.04	0.0098	0.0141
9.24	0.0083	0.0128

Die Spaltung der verschiedenen Phosphorsäureester. 169

H. β -Phenäthylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (A).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
8.02	0.0061	0.0105	0.0212
8.59	0.0112	0.0182	0.0295
9.02	0.0145	0.0212	0.0312
9.13	0.0137	0.0201	0.0295
9.52	0.0092	0.0141	0.0190

I. Benzylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	½ St.	1 St.	2½ St.
8.32	0.0115	0.0191	0.0278
8.62	0.0148	0.0245	0.0310
9.08	0.0250	0.0310	0.0313
9.20	0.0260	0.0312	0.0310
9.38	0.0274	0.0311	0.0312
9.61	0.0185	0.0245	0.0295

J. Phenylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	¼ St.	½ St.	2 St.
8.02	0.0112	0.0178	0.0310
8.81	0.0175	0.0257	0.0312
9.16	0.0215	0.0295	0.0310
9.26	0.0235	0.0302	0.0313
9.74	0.0277	0.0310	0.0310
9.90	0.0282	0.0312	0.0313
10.07	0.0265	0.0305	0.0312
10.40	0.0206	0.0277	0.0310

K. Phenylphosphorsäure (M/25) + $\frac{1}{2}$ Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{4}$ St.	$\frac{1}{2}$ St.	2 St.
8.67	0.0099	0.0190	0.0621
8.92	0.0135	0.0245	0.0742
9.55	0.0230	0.0401	0.1123
10.12	0.0285	0.0471	0.1190
10.28	0.0301	0.0497	0.1175
10.50	0.0249	0.0385	0.0790
11.08	0.0117	0.0168	0.0287
11.27	0.0064	0.0084	0.0105

L. o-Kresylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{4}$ St.	$\frac{1}{2}$ St.	2 St.
8.31	0.0091	0.0155	0.0310
8.65	0.0175	0.0268	0.0312
9.26	0.0242	0.0295	0.0312
9.52	0.0468	0.0312	0.0313
9.85	0.0285	0.0310	0.0313
10.21	0.0252	0.0293	0.0310

M. Diphenylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
6.80	0.0112	0.0167
7.81	0.0129	0.0193
8.35	0.0115	0.0172
9.02	0.0081	0.0123
9.30	0.0068	0.0103

N. Di-*o*-Kresylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
6.72	0.0098	0.0157
7.82	0.0117	0.0172
9.03	0.0074	0.0115

O. Di- β Glycerophosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
7.02	0.0043	0.0059
7.83	0.0053	0.0069
9.01	0.0036	0.0049

P. Diäthylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment (B).

Ph \ Zeit	24 St.	48 St.
7.05	0.0310	0.0385
7.78	0.0348	0.0481
9.07	0.0240	0.0326

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1928): Journ. of Biochem., **10**, 157.
 Carré, P. (1905): Ann. chim. Phys. [8] **5**, 345.
 Cavalier, J. (1898): C.r.d.l'Acad. des Sciences, **126**, 1214.
 Fischer, E. und Pfähler, E. (1920): Ber. d. Deutsch. chem. Gesel. **53**, 1615.
 Inouye, K. (1928): Journ. of Biochem., **10**, 133.
 Iwatsuru, R. (1926): Biochem. Zeitschr. **173**, 348.
 Jacobson, G. (1875): Ber. d. Deutsch. Chem. Gesel., **8**, 1521.
 Kobayashi, H. (1926): Journ. of Biochem., **6**, 261.
 Kobayashi, H. (1927): Journ. of Biochem., **8**, 205.
 Lossen, W. und Köhler, A. (1891): Ann. chem. pharm., **262**, 206.

- Michaelis, L. und Davidsohn, H. (1911): *Biochem. Zeitschr.*, **35**, 386.
Michaelis, L. (1914): *Biochem. Zeitschr.*, **60**, 91.
Michaelis, L. und Rothstein, M. (1920): *Biochem. Zeitschr.*, **110**, 217.
Meyerhof, O. und Suranyi, J. (1926): *Biochem. Zeitschr.*, **178**, 427.
Northrop, J. H. (1920): *Jour. of general Physiol.*, **3**, 211.
Northrop, J. H. (1923): *Jour. of general Physiol.*, **5**, 263.
Northrop, J. H. and Simms, H. S. (1928): *Jour. of general Physiol.*
12, 313.
Pekelharing, C. A. und Ringer, W. E. (1911): *Zeitschr. f. Physiol.*
chem., **7**, 282.
Rapp, M. (1884): *Ann. d. Chem.*, **224**, 157.
Tutin, F. and Hann, A. C. O. (1906): *Jour. of chem. Soc. London*, **89**,
1754.
Zuttsche, F. und Aeschlimann, F. (1926): *Helv. chim. acta.*, **9**, 708.
Zetzsche, F. und Nachmann, M. (1925): *Helv. chim. acta.*, **8**, 943.

DIE FERMENTATIVE SPALTUNG DER DIPHOSPHOGLYCERINSÄURE.

VON

HIDEO KOBAYASHI.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 29. Juni 1929.)

Die Wirkung der Glycerophosphatase auf das α - und β -Glycerophosphat wurde von Asakawa (1929) im hiesigen Institut untersucht. Nach seiner Angabe werden die beiden Substrate von der Nierenglycerophosphatase fast in gleichem Betrag gespalten, aber interessanter Weise zeigen die Substanzen ein ganz eigentümliches Verhalten gegen das gereinigte Ferment aus *Aspergillus oryzae*. Die β -Form wird bei Ph 3 optimal gespalten, wie bei uns wiederholt nachgewiesen wurde. Die optimale Spaltung der α -Form ist dagegen bei Ph 5.6 vorhanden. Diese Acidität ist ebenfalls das Optimum, wenn die β -Form durch das ungereinigte Ferment angegriffen wird.

Die Verschiebung der optimalen Acidität bei der Spaltung des β -Glycerophosphats wird, wie von Kobayashi (1927) und Inouye (1928) untersucht, von einer Art Paralysator verursacht, dessen Wirkungsmechanismus durch seine Bindung an die als Kation dissoziierte Fermentampholyte zu erklären ist. Dadurch kommt es theoretisch und experimentell vor, dass die Spaltung des β -Glycerophosphats durch das Ferment bei Ph 5.6 fast in gleichem Betrag erfolgt, und es ist einerlei, ob es frei von dem Paralysator ist, oder ob er beigemischt ist.

Es war sehr merkwürdig, dass das α - und β -Glycerophosphat bei Ph 5.6 von der oben erwähnten gereinigten Takaphosphatase unter gleichen Bedingungen mit fast gleicher Geschwindigkeit gespalten wurde. Als das Medium noch angesäuert wurde,

beschleunigte sich die Spaltung der β -Form entsprechend der Aciditätszunahme weiter bis Ph 3, aber die Spaltung der α -Form wurde immer herabgesetzt.

Es ist darum interessant, das Verhalten eines Substrats, das die Phosphorsäurereste in α - und β -Stellung gleichzeitig enthält, zu den Phosphatasen zu untersuchen. Zu diesem Zweck steht uns die Diphosphoglycerinsäure zur Verfügung. Diese Substanz wurde zuerst von Greenwald (1926) aus den Erythrocyten der Hunde, Schweine und Menschen als Bariumsalz isoliert; späterhin gelang es Jost (1927), sie als Brucinsalz schön kristallisiert zu erhalten. Das Verhalten dieser Substanz unter der Einwirkung verschiedener Organe wurde von Jost untersucht. Muskel, Milz, und Knochenmark zeigten keine wesentliche, Leber nur geringfügige Spaltung. Dagegen war beim Nierengewebe eine starke Spaltungsfähigkeit festzustellen. Diese Experimente wurden zuerst nachgeprüft, und zwar mit Nieren- und Knochenphosphatasen. Unsere Fermentlösung wurde nach der Autolyse der Organe und der darauf folgenden Dialyse hergestellt und war praktisch frei von Phosphor. Nierenphosphatase spaltete die Diphosphoglycerinsäure über 70% in 24 Stunden bei 37°C in der Acidität von Ph 8.0. Bei der Knochenphosphatase wurde eine Spaltung von 68% in 96 Stunden unter denselben Bedingungen beobachtet. Da die Aktivität der gebrauchten Knochenphosphatasen ungefähr $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{3}$ der Nierenphosphatase, auf Glycerophosphat unter derselben Bedingung geprüft, beträgt, kann man wohl schliessen, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen den Wirkungen der beiden Phosphatasen gegenüber der Diphosphoglycerinsäure vorhanden ist.

Das Verhalten dieser Säure zu der Phosphatase aus *Aspergillus Oryzae*, Takaphosphatase, ist interessant. Mit dem unbehandelten Ferment wird sie optimal bei Ph 5.6 hydrolysiert, was mit dem Ergebnis bei dem α - und β -Glycerophosphat übereinstimmt. Mit dem gereinigten Ferment ist aber das Ergebnis ganz auffallend. Die Diphosphoglycerinsäure wurde von solcher Fermentlösung bei Ph 2.9 und 5.50 mit der fast gleichen Geschwindigkeit gespalten.

Zwischen diesen beiden Aciditäten war eine geringere Hydrolyse nachzuweisen, und bei Ph 4.0 war sie minimal. Die Spaltung der Diphosphoglycerinsäure, die bei dem ungereinigten Ferment nur einen einzigen Gipfel in der Ph-Aktivitätskurve besass, bekam nun ein anderes Optimum in Ph 3. Dies ist, wie von Inouye angegeben, eine der Hydrolyse des β -Glycerophosphats spezifische optimale Acidität.

Es handelt sich hier um die spezifische Spaltbarkeit der zwei Phosphorsäurereste in α - und β -Stellung.

Ich habe vor diesem Versuch mit der gereinigten Fermentlösung die Hydrolyse des α - und β -Glycerophosphats geprüft und konnte die oben erwähnte Angabe von Asakawa bestätigen. Nach seiner Meinung ist das Ferment, das die beiden Monoglyceride angreift, wesentlich einheitlich. Die Reinigung des Ferments durch die Adsorptionsmethode hat die Befreiung eines Paralysators, der X-Substanz, erzielt, deren Wirkung sich spezifisch auf die Hydrolyse des β -Glycerids beschränkt.

Was man bei dem Ergebnis des vorliegenden Versuchs in Erwägung ziehen soll, ist zweierlei. Es ist einmal die abnorm geringe Wirksamkeit des Ferments in der Gegend von Ph 4.0, und dann die im Betrag fast gleiche Spaltung bei Ph 3 und 5.5. Augenblicklich scheinen diese Ergebnisse mit dem oben erwähnten Resultat von Asakawa bei dem α - und β -Glycerophosphat nicht zusammenzufallen. Wir wissen aber nun, dass es eine Art Substanz gibt, die sich an die Phosphatase bindet und dadurch eine eigentümliche Ph-Abhängigkeit der Abspaltung des β -Phosphorsäurerests verursacht. Ein Beispiel ist NaF, das von Inouye untersucht wurde. Dieses Salz wirkte in sehr verdünnten Konzentrationen hemmend auf jenes Ferment und erzeugte die zweite optimale Acidität, bei den untersuchten Fällen in Ph 5.6–5.8, während die Lage des der β -Säureabspaltung spezifischen Optimums keine verstreichende war. Das wirksame Agens dieses Salzes ist das Fluorion.

Wir wollen einmal bei der Diphosphoglycerinsäure ihrer

Carboxylgruppe eine Bedeutung beilegen und in der Wirkung des an dieser Gruppe dissoziierten Anions eine Analogie mit dem Fluorion annehmen. Die grösste Spaltung hinsichtlich des β -Phosphorsäurerests soll bei Ph 3 angenommen werden und die mässige bei Ph 5.5. Da die α -Phosphorsäureabspaltung andererseits aber unter den gegebenen Bedingungen noch bei Ph 5.5 optimal fortschreiten soll, addiert sich diese α -Säurespaltung in dieser Acidität mit jener β -Säurespaltung, und der ganze Betrag der abgespalteten Phosphorsäure kann als gleich bei Ph 3 vorkommen, wo die β -Säurespaltung überhand nehmen soll. Zwischen Ph 3 und 5.6 kommt die Beeinflussung des Anions zum Vorschein und die minimale Hydrolyse ist zu beobachten. Im ganzen untersuchten Ph-Gebiet werden die beiden Phosphorsäurereste, obwohl in verschiedener Geschwindigkeit, doch wohl abgesprengt, wie man es erwarten kann. Darum kommt der gesamte gebundene Phosphor in lang fortgesetzten Versuchen gänzlich als anorganischer zu Tage.

Daraus wird das abnorme Verhalten der Diphosphoglycerinsäure zu der Takaphosphatase erklärt werden können. Jedenfalls ist es von grossem Interesse, dass sich derselbe Bestandteil in einem einzigen zusammengesetzten Molekül je nach der Bindungsstelle bei der Abspaltung durch Ferment verschieden verhält. Ob die analoge Erscheinung bei den kompliziert aufgebauten Substanzen, z.B. bei Lipid, Polysaccharid, Eiweiss oder Polypeptid mit dem entsprechenden Fermente beobachtet wird, werden zukünftige Versuche zeigen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Diphosphoglycerinsäure wurde nach Jost (1927) aus Pferdeerythrocyten als Brucinsalz kristallinisch bekommen. Das wasserfreie Salz schmolz bei 174°C. Aus 9 g lufttrocknem Brucinsalz wurde die freie Säure wieder genau nach Josts Angabe hergestellt. Diese Lösung wurde mit N. NaOH gegen Lackmus neutralisiert und auf 100 ccm mit Wasser verdünnt. 1 ccm dieser

Lösung enthielt 1.333 mg P. Da das lufttrockene Brucinsalz noch etwa 20% Wasser enthalten sollte, war die Ausbeute der Säure als Natriumsalz fast quantitativ.

Die Nierenphosphatase wurde nach Asakawas Angabe aus vom Schlachthaus frisch bezogener Schweineniere hergestellt. 80 g des zermahlenen Organbreis wurden in 800 ccm Chloroform-Wasser suspendiert, mit Toluol überschichtet, 48 Stunden unter gelegentlichem Schütteln in den Brutschrank (37°) gestellt. Danach wurde der Brei mit 0.8 ccm Essigsäure (30%) versetzt und noch 24 Stunden bei derselben Temperatur gelassen. Das Autolysat wurde nun klar filtriert und im Kollodiumsack gegen destilliertes Wasser 48 Stunden dialysiert. Die erhaltene Fermentlösung war praktisch frei von anorganischem Phosphor.

Knochenphosphatase wurde aus den zerstoßenen Extremitätenknochen und Rippen des durch Carotisschnitt entbluteten jungen Kaninchens in derselben Weise wie das Nierenferment hergestellt.

Die Reinigung der Takaphosphatase wurde durch die Adsorptionsmethode (Inouye, 1928; Kobayashi, 1927) ausgeführt.

Die Regulation der Wasserstoffzahl wurde in der sauren Reaktion mit M/2 Essigsäure-Acetat, in alkalischer Reaktion mit M/10 Glykokoll-Natronlauge erzielt.

Die gesamten Versuche wurden bei 37°C ausgeführt und zwar in den ersten 4–5 Stunden im elektrisch regulierten Wasserbad und bei den weiter fortgesetzten Versuchen dann im Brutschrank.

Ph wurde 4–5 Minuten nach jeder Anstellung des Versuchs elektrometrisch ermittelt. Der anorganische Phosphor kolorimetrisch nach Briggs.

Die in den Protokollen angegebenen Zahlen bedeuten mg des anorganischen Phosphors in 1 ccm des Hydrolysgemisches.

Versuch 1.

Die Wirkung der Nierenphosphatase auf die Diphosphoglycerinsäure

Natr. Diphosphoglycerat

2.5 ccm

M/10 Glykokoll-Natronlauge . 5.0 ccm
 Wasser 12.5 ccm
 Nierenphosphatase 5.0 ccm

Zeit Ph	1 St.	2 St.	4 St.	24 St.
8.00	0.0085 mg	0.0159 mg	0.032 mg	0.0953 mg
8.70	0.0063 „	0.0086 „	0.0115 „	0.0294 „

In 24 Stunden wurde die Säure über 70% abgebaut. Vor dem Versuch habe ich die Wirkung des Ferments auf das Natr. Glycerophosphat geprüft. Sie war hoch aktiv.

Versuch 2.

Die Wirkung der Knochenphosphatase auf die Diphosphoglycerinsäure. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei dem Nierenferment.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	24 St.	96 St.
8.00	0.0068 mg	0.0107 mg	0.0512 mg	0.0906 mg
8.50	0.0067 „	0.0110 „	0.0199 „	0.0596 „
9.25	0.0031 „	0.0061 „	0.0165 „	0.0293 „

Bei Ph 8.0 wurde der Ester in 96 Stunden beinahe 68% gespalten. Das Ferment war auch sehr wirksam gegen Natr. Glycerophosphat (Kahlbaum).

Versuch 3.

Die Wirkung der unbehandelten Takaphosphatase auf die Säure.

Natr. Diphosphoglycerat 2.5 ccm
 M/2 Essigsäure-Acetat 5.0 ccm

Die fermentative Spaltung der Diphosphoglycerinsäure. 179

Wasser 12.5 ccm
2% Takadiastase 5.0 ccm

Zeit Ph	1 St.	2 St.	4 St.	24 St.
3.57	0.0072 mg	0.0113 mg	0.0211 mg	0.0767 mg
4.11	0.0161 „	0.0254 „	0.0377 „	0.1041 „
5.00	0.0280 „	0.0415 „	0.0606 „	0.1260 „
5.64	0.0490 „	0.0736 „	0.1015 „	0.1290 „
6.12	0.0371 „	0.0547 „	0.0751 „	0.1264 „

Die Diphosphoglycerinsäure wurde also wie das Glycero-phosphat mit der unbehandelten Takaphosphatase wieder bei Ph 5.6 maximal gespalten.

Versuch 4 a.

Die Wirkung des gereinigten Ferments auf α - und β -Glycero-phosphat. Vor dem Hauptversuch mit dem Diphosphoglycerat habe ich den vorliegenden Versuch ausgeführt, um die Angabe von Asakawa zu bestätigen.

M/100 α - oder β -Glycerophosphat 2.5 ccm
M/2 Essigsäure-Acetat 5.0 ccm
Wasser 12.5 ccm
Fermentlösung 5.0 ccm

	Zeit Ph	½ St.	1 St.	2½ St.
α	3.13	0.0052 mg	0.0069 mg	0.0139 mg
	5.51	0.0062 „	0.0102 „	0.0180 „
β	3.20	0.0184 „	0.0241 „	0.0296 „
	5.53	0.0073 „	0.0109 „	0.0192 „

Das Ausgangspräparat für die Reinigung war verschieden von dem des vorigen Versuchs. Doch konnte ich wohl annehmen, dass die Befreiung von dem Paralysator vollständig erzielt worden war. Der nächste Versuch wurde auch mit dieser gereinigten Fermentlösung vorgenommen.

Versuch 4 b.

Die Wirkung der gereinigten Takaphosphatase auf die Diphosphoglycerinsäure.

Natr. Diphosphoglycerat	2.5 ccm
M/2 Essigsäure-Acetatgemisch oder M/10 Glykokoll-Salzsäure	5.0 ccm
Wasser	12.5 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm

Ph \ Zeit	Anorg. Phosphor in mg					
	1 St.	2 St.	4 St.	24 St.	48 St.	72 St.
2.50	0.0072	0.0145	0.0213	0.0451	—	—
2.94	0.0112	0.0218	0.0390	0.0896	—	—
3.08	0.0112	0.0213	0.0362	0.0847	—	—
3.21	0.0087	0.0195	0.0351	—	0.114	—
3.38	0.0060	0.0120	0.0210	0.0734	—	—
3.97	0.0029	0.0054	0.0117	—	—	0.130
4.89	0.0072	0.0123	0.0224	0.105	0.134	—
5.50	0.0113	0.0219	0.0378	0.118	0.133	—

Die Konzentration unserer Diphosphoglycerinsäurelösung war 0.0215 mol, und bei jedem Ansatz war sie, noch in 10 facher Verdünnung verdünnt, also in 0.00215 Mol, vorhanden. Dagegen war die schliessliche Konzentration des Glycerophosphats bei jedem Isomer M/1000. Der Glycerinsäureester war also ungefähr 2 mal so stark konzentriert wie das Glycerid, selbst wenn es nur den α -

oder β -Phosphorsäurerest betrifft. Trotzdem sah man überhaupt eine geringere Abspaltung des anorganischen Phosphors und konnte wohl annehmen, dass der Glycerinsäureester schwerer angreifbar als das Glycerid war. Dies ist auf den hemmenden Einfluss des an der Carboxylgruppe dissoziierten Anions zurückzuführen, wie schon oben erörtert wurde.

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1928): Jour. of Biochem., **10**, 157.
do. (1929): do., **11**, 143.
Greenwald, I. (1925): Jour. of Biol. Chem., **63**, 339.
Inouye, K. (1928): Jour. of Biochem., **10**, 133.
Jost, H. (1927): Zeitschr. phys. Chem., **165**, 171.
Kobayashi, H. (1927): Jour. of Biochem., **8**, 205.

ÜBER DEN GEHALT AN GLUTATHION IN DEN DENERVIERTEN SKELETTMUSKELN.

VON

MIZUHO OKUDA.

*(Aus dem physiologischen Institut der Universität zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.)*

(Eingegangen am 1. Juli 1929.)

EINLEITUNG.

Die Autooxydation und Autoreduktion der Zelle ist schon lange von vielen Forschern studiert worden.

1888 zeigte de Rey Pailhade, dass die Hefe und der wässrige Extrakt derselben die Fähigkeit hat, den Schwefel auf Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Er gab dieser so wirkenden Substanz den Namen Philathion. Danach zeigte er, dass nicht nur die Hefe sondern auch viele tierische Gewebe dieselbe Substanz enthielten.

Gola fand in befruchtetem Pflanzengewebe eine Substanz die positive Nitoprussidreaktion aufweist, und auch Buffa fand dieselbe Reaktion im tierischen Gewebe.

Heffter wies 1908 die positive Nitoprussidreaktion in vielen Geweben und Gewebsextrakten nach.

Betreffs des Wesens dieser Reaktion zeigte Arnold zuerst, dass es eine Eiweissreaktion ist, aber später glaubte er, dass es sich wahrscheinlich um eine Reaktion des freien Cysteins handle, weil er eine deutliche Reaktion in eiweissfreiem Gewebsextrakt bemerkte.

Heffter stellt die Tatsache fest, dass Cystein leicht oxydabel in Cystin ist, und Cystin seinerseits mit Natrium-Thiosulfat zu Cystein reduzierbar ist. Seine Erklärung lautet etwa folgendermassen: Es existiert in der Zelle eine Substanz ähnlich wie

schwefligsaures Salz, die den Sauerstoff von Wassermolekülen aufnimmt. Der dabei frei gewordene Wasserstoff reduziert die -S-S- Gruppe zur -SH Gruppe, worauf die -SH Gruppe wieder leicht zur -S-S- Gruppe zurückkehrt, und diese Reaktion wiederholt sich mehrmals, sodass eine Oxydation und die Reduktion der Zelle fortwährend stattfindet. Aber diese Anschauung blieb nur eine Hypothese ohne experimentelle Begründung.

Erst 1921 wies Hopkins nach, dass sich in den Geweben die Dipeptide von Cystein und Glutaminsäure befinden, welche positive Nitroprussidreaktion zeigen, und meinte, dass diese Dipeptide eine grosse Bedeutung für die Oxydation und Reduktion der Zelle haben. Er nennt diese Substanz Glutathion.

1925 veröffentlichte Tunnicliffe eine Bestimmungsmethodik des Glutathion, und seither erschienen eine grosse Anzahl von interessanten Experimenten hintereinander.

Nach den bisherigen Mitteilungen ist diese Substanz in fast allen tierischen und pflanzlichen Geweben mit Ausnahme von Serum, Plasma, Bindegewebe und Vogeleiern vorhanden.

Nach Hopkins geht die Menge dieser Substanz im allgemeinen mit der Stoffwechselgrösse der Organe parallel.

Die Versuche von Langley und Itagaki, welche zeigten, dass der denervierte Muskel mehr Sauerstoff als der gesunde verbraucht, führten mich zu der Untersuchung, den Glutathiongehalt zwischen denervierten und gesunden Muskeln zu vergleichen.

VERSUCHSMETHODIK.

Als Versuchsmaterial wurden Kaninchen gebraucht. Auf einer Seite wurde der N. ischiadicus durchschnitten und auf der anderen Seite der Nerv als Kontrolle in gesundem Zustand belassen. Nach 3, 5, 10 und 20 Tagen nach der Operation wurden die Tiere getötet, sofort der M. gastrocnemius und M. soleus herausgeschnitten und gewogen, dann wurde der Glutathiongehalt der beiderseitigen Muskeln nach der von Perizweig und Delrue modifizierten Methode Tunnicliffes bestimmt. Die Operation wurde immer

streng aseptisch ausgeführt, und wenn eine Infektion vorhanden war, wurde auf den Versuch ohne weiteres verzichtet.

TABELLE I. Gesunde Kaninchen.

Datum	Körpergewicht (kg)	Geschl.	Seite	Muskelgewicht (g)	N/100 J ₂ (ccm)	red. Glutathion	
						(mg)	(%)
1/III.	2,2	♂	links	12,2	2,4	6,00	0,049
			rechts	12,0	2,3	5,75	0,047
1/III.	2,2	♀	links	12,5	2,1	5,25	0,042
			rechts	12,4	2,1	5,25	0,042
1/III.	2,0	♀	links	11,7	1,9	4,75	0,040
			rechts	11,7	2,0	5,00	0,043
4/III.	2,0	♂	links	11,6	1,7	4,25	0,037
			rechts	11,8	1,6	4,00	0,034
4/III.	2,2	♂	links	13,4	2,5	6,25	0,047
			rechts	13,5	2,5	6,25	0,046
6/III.	2,1	♀	links	12,5	2,4	6,00	0,048
			rechts	12,4	2,4	6,00	0,048
7/IV.	2,0	♀	links	10,5	1,8	4,50	0,043
			rechts	10,5	1,8	4,50	0,043
7/IV.	2,1	♂	links	12,2	2,8	7,00	0,057
			rechts	12,3	2,9	7,25	0,059
26/IV.	2,0	♂	links	11,7	2,5	6,25	0,053
			rechts	11,5	2,5	6,25	0,054
3/V.	2,1	♂	links	12,2	2,1	5,25	0,043
			rechts	12,0	2,1	5,25	0,044
4/V.	2,0	♀	links	12,2	2,0	5,00	0,041
			rechts	12,3	2,0	5,00	0,041
14/V.	2,2	♂	links	14,4	3,0	7,50	0,052
			rechts	14,5	3,0	7,50	0,052
15/V.	2,0	♀	links	10,9	2,3	5,75	0,053
			rechts	10,8	2,2	5,50	0,051
15/V.	2,0	♂	links	11,5	2,4	6,00	0,052
			rechts	11,2	2,4	6,00	0,054
18/V.	2,3	♂	links	15,1	2,9	7,25	0,048
			rechts	14,7	2,8	7,00	0,048
Durchschnitt	2,1	—	links	12,3	—	—	0,047
			rechts	12,2	—	—	0,047

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. *Glutathiongehalt der gesunden Muskeln.*

Vor den eigentlichen Versuchen habe ich den Glutathiongehalt der beiderseitigen gesunden Muskeln gemessen. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefasst.

In allen 15 Fällen waren das Gewicht und der Glutathiongehalt der beiderseitigen Muskeln fast gleich, und zwar betrug der Glutathiongehalt 0,034 bis 0,059%, durchschnittlich 0,047%. Diese Werte stimmen fast mit den Angaben von Tunnicliffe u.a. überein.

B. *Vergleich des Glutathiongehalts der denervierten und gesunden Muskeln.*

Die Resultate sind in der II. bis V. Tabelle verzeichnet.

TABELLE II. Am 3. Tage nach der Operation.

Datum	Körpergewicht (kg)	Geschl.	Seite	Muskelgewicht (g)	N/100 J ₂ (ccm)	red. Glutathion	
						(mg)	(%)
3/III.	2,3	♀	operierte	15,6	3,0	7,50	0,048
			gesunde	16,0	2,7	6,75	0,042
15/III.	2,0	♀	operierte	14,5	2,4	6,00	0,041
			gesunde	14,5	1,8	4,50	0,031
27/III.	2,0	♂	operierte	12,1	2,2	5,50	0,045
			gesunde	12,2	2,0	5,00	0,041
30/III.	2,3	♂	operierte	12,6	2,1	5,25	0,042
			gesunde	12,6	1,9	4,75	0,037
2/IV.	2,1	♂	operierte	11,7	2,5	6,25	0,053
			gesunde	11,8	2,2	5,50	0,049
16/V.	2,0	♀	operierte	12,9	2,7	6,75	0,052
			gesunde	12,7	2,5	6,25	0,049
16/V.	2,0	♂	operierte	12,4	2,4	6,00	0,048
			gesunde	12,4	2,3	5,75	0,046
Durchschnitt	2,1	—	operierte	13,1	—	—	0,047
			gesunde	13,2	—	—	0,042

TABELLE III. Am 5. Tage nach der Operation.

Datum	Körpergewicht (kg)	Geschl.	Seite	Muskelgewicht (g)	N/100 J ₂ (ccm)	red. Glutathion	
						(mg)	(%)
12/III.	1,9	♂	operierte	9,2	2,0	5,00	0,054
			gesunde	9,2	1,4	3,50	0,038
24/III.	2,3	♂	operierte	10,4	2,2	5,50	0,053
			gesunde	11,3	1,8	4,50	0,040
24/III.	2,0	♀	operierte	10,1	2,1	5,25	0,052
			gesunde	10,8	1,8	4,50	0,042
28/III.	2,0	♂	operierte	9,2	2,2	5,50	0,060
			gesunde	9,7	1,7	4,25	0,044
1/IV.	2,0	♀	operierte	11,0	2,4	6,00	0,054
			gesunde	11,2	1,9	4,75	0,042
1/V.	2,0	♂	operierte	11,1	3,1	7,75	0,070
			gesunde	11,9	2,5	6,25	0,053
1/V.	2,1	♂	operierte	10,7	3,0	7,50	0,070
			gesunde	11,5	2,3	5,75	0,050
Durchschnitt	2,0	—	operierte	10,2	—	—	0,059
			gesunde	10,8	—	—	0,044

TABELLE IV. Am 10. Tage nach der Operation.

Datum	Körpergewicht (kg)	Geschl.	Seite	Muskelgewicht (g)	N/100 J ₂ (ccm)	red. Glutathion	
						(mg)	(%)
17/III.	2,3	♂	operierte	9,0	2,9	7,25	0,080
			gesunde	9,8	2,2	5,50	0,056
24/III.	2,2	♀	operierte	8,9	2,5	6,25	0,070
			gesunde	11,3	2,0	5,00	0,044
29/III.	1,9	♂	operierte	10,2	3,6	9,00	0,088
			gesunde	12,9	2,4	6,00	0,046
29/III.	2,3	♀	operierte	10,5	2,6	6,50	0,062
			gesunde	12,7	1,9	4,75	0,037
29/III.	2,2	♀	operierte	7,5	2,4	6,00	0,080
			gesunde	9,4	1,8	4,50	0,048
7/V.	2,0	♂	operierte	13,2	2,9	7,25	0,055
			gesunde	14,7	2,2	5,50	0,037
7/V.	2,0	♂	operierte	8,8	2,5	6,25	0,071
			gesunde	11,2	1,7	4,25	0,038
Durchschnitt	2,1	—	operierte	9,7	—	—	0,072
			gesunde	11,7	—	—	0,044

TABELLE V. Am 20. Tage nach der Operation.

Datum	Körpergewicht (kg)	Geschl.	Seite	Muskelgewicht (g)	N/100 J ₂ (ccm)	red. Glutathion	
						(mg)	(%)
27/III.	2,2	♂	operierte	8,1	3,1	7,75	0,096
			gesunde	13,1	1,9	4,75	0,036
29/III.	2,3	♂	operierte	8,4	2,2	5,50	0,065
			gesunde	13,7	2,0	5,00	0,036
4/IV.	2,0	♂	operierte	6,5	1,8	4,50	0,069
			gesunde	11,7	2,5	6,25	0,053
7/IV.	2,1	♀	operierte	7,2	2,2	5,50	0,076
			gesunde	12,0	2,0	5,00	0,042
8/IV.	2,0	♂	operierte	5,8	2,0	5,00	0,086
			gesunde	10,4	2,3	5,75	0,055
30/IV.	2,0	♀	operierte	6,5	2,3	5,75	0,088
			gesunde	9,8	2,2	5,50	0,056
30/IV.	2,1	♂	operierte	6,1	2,2	5,00	0,090
			gesunde	10,0	2,1	5,25	0,052
Durchschnitt	2,1	—	operierte	6,9	—	—	0,081
			gesunde	11,5	—	—	0,047

Am 3. Tage nach der Operation ist der Unterschied des Gewichts zwischen den beiden Muskelarten noch nicht deutlich, doch der Glutathiongehalt ist in den denervierten Muskeln grösser als in den gesunden Muskeln, und zwar ist er um 4–32%, durchschnittlich um 12%, vermehrt. Am 5. Tage ist der Unterschied des Gewichts nur noch gering, doch der Glutathiongehalt der denervierten Muskeln vermehrt sich bis zu 23–42%, durchschnittlich auf 34%. Am 10. Tage ist der Unterschied des Gewichts der beiden Muskeln deutlicher, und der Glutathiongehalt der denervierten Muskeln steigt auf 45–90%, durchschnittlich auf 64%. Am 20. Tage ist der Glutathiongehalt der denervierten Muskeln 30–167%, durchschnittlich 72% grösser, und der Unterschied der Muskelgewichte ist entsprechend sehr deutlich.

Der Glutathiongehalt der denervierten Muskeln (bis Z. 20. Tage nach d. Operation) ist fast ohne Ausnahme grösser als der der gesunden, sodass man ohne weiteres schliessen kann, dass mindes-

tens in gewissen Zeiträumen nach der Denervation der Glutathiongehalt in den Muskeln stets zunimmt.

DISKUSSION.

Die Veränderung der denervierten Muskeln ist schon 1916 von Langley beim Kaninchen untersucht worden. Er schnitt den N. tibialis ab und reizte täglich den M. gastrochemius mit elektrischem Strom. Auf diese Weise wird der Muskel wiederholt in Aktion gesetzt. Er konnte dabei die Gewichtsabnahme nicht verhindern und beobachtete gleichzeitig in den denervierten Muskeln kontinuierliche fibrilläre Zuckungen. Darauf behauptete er, dass die Atrophie bei denervierten Muskeln hauptsächlich Ermüdungsatrophie und keineswegs eine einfache Inaktivitätsatrophie ist.

1917 fanden Langley und Itagaki an der Katze, dass der Sauerstoffverbrauch der denervierten Muskeln grösser ist als der der gesunden Muskeln. Sie behaupteten, dass diese Atrophie nicht nur auf Verminderung des Muskelbildungsvermögens sondern hauptsächlich auf Vermehrung der Muskelzerfallerscheinungen beruht.

In meinen Experimenten tritt zuerst die Vermehrung des Muskelglutathion auf, dann folgt eine allmähliche Verminderung der Muskelgewichte in den denervierten Muskeln.

Heute kann ich noch nichts Bestimmtes über das Verhältnis meiner Befunde zu Langleys Ansicht sagen, aber wenn die Zunahme des Glutathiongehalts mit der Stoffwechselgrösse parallel geht, so ist es wahrscheinlich, dass in den denervierten Muskeln der Stoffwechsel stärker ist als in den gesunden Muskeln.

LITERATUR.

- Arnold (1911): Zeitschr. physiol. Chem., **70**, 300.
Buffa: zit nach Hopkins (1921).
de Rey Pailhade (1888): Cpt. rend. soc. biol. **106**, 107.
Cola: zit nach Hopkins (1921).
Heffter (1908): Med. naturw. Arch., **1**, 81.
Hopkins (1921): Biochem. J., **15**, 286.

Langley (1916): Jl. physiol., **50**, 343.

Langley u. Itagaki (1917): Journ. physiol., **51**, 202.

Perizweig u. Delrue (1927): Biochem. Jl., **21**, 1416.

Tunnicliffe (1925): Biochem. Jl., **19**, 194.

P.S.—Herr Prof. Dr. Itagaki war so freundlich mich wissen zu lassen, dass Dr. Hirohashi unter seiner Leitung auf Grund umfangreicher Untersuchungen zu ähnlichen Resultaten gekommen ist. Diese wurden neulich in der Sitzung der ärztlichen Vereinigung an der Kaiserlichen Kyushu-Universität mitgeteilt. *D. Ogata.*

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

V. The Calcium and Phosphorus Metabolism of Guinea Pigs fed on a Vitamin C Free Diet.

By

TAKEYOSHI NAGAYAMA and TASUKU MUNEHISA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry of the Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo.)

(Received for publication, July 20, 1929.)

Hitherto, the investigation upon phosphorus and calcium have maintained a main part in the studies upon the metabolism of mineral substances in an animal deprived of vitamin C. Hans V. Euler and Karl Myrbäck (1925) determined the content of phosphate and calcium in the blood of guinea pigs and rats in many different cases brought forth by the addition of various amounts of vitamin C or A. According to their results, the amount of blood calcium of the vitamin C free guinea pigs is almost the same as the normal value (average 0.069 mg. per gm. blood); namely it corresponds to 11 mg in 100 cc. of serum. On the contrary, they state, the phosphate in blood decreases so remarkably and so constantly that the change in the amount of phosphate in blood should be a "quantitatives Kriterium" of the study on vitamin C in guinea pigs. E. Edestein and Schmal (1926) reported, however, in their study upon blood chemistry of experimental scurvy, that the amount of calcium and phosphate of the normal guinea pigs was apt to vary to a tolerable extent; namely Ca was 10.1–14 mg% and P was 6.6–10 mg%, and each average value was respectively 11.95 mg% and 8.09 mg%. The amount of calcium was not influenced at all by the lack of vitamin C and the phosphate content also showed no remarkable change except a few cases where diminution was somewhat notable. On the amount of calcium in urine of scorbutic animal, K. Tomita (1928) of our laboratory, reported that it showed a slight decrease.

EXPERIMENTAL METHOD.

Guinea pigs, weighing from 500 to 700 gm. were previous to the experiment fed on Sherman's Vitamin C free diet with the supplement of 5 gm. of fresh radish and with the free access to water until their body weight and the amount of food taken daily become almost stationary. The cages described in the previous paper (Nagayama, Machida and Takeda, 1928) were used. Every morning at a definite time and before the meal the body weight of animals and the amount of the food ingested in the previous day were measured, and then a fresh portion of food was supplied.

The urine and feces were gathered every third day, and calcium and phosphorus were determined each time. For a certain period this experiment was kept up, and then fresh radish in ration was replaced, by the same amount of radish boiled for 2 hours at 110°C was given.

When scurvy reached the worst state, or a few days before death the blood was drawn from the animal, with the empty stomach on that day, by the jugular vein without any contamination of the body fluid. Those fed on a vitamin C free diet were killed at the end of a week, without any regard to the state of the disease and their blood was examined. In this case, it is proved on dissection that they were not complicated with any other disease than scurvy. From the normal animals after feeding for 7-10 days with Sherman's diet and fresh radish, blood was drawn with the same care as before.

The method used for analysis was as follows:

a. Calcium and Phosphate in Serum.

When blood, drawn from the jugular vein, is allowed to stand over night in an ice box the serum separates gradually. The serum was obtained by centrifugation. For precipitating protein materials of the serum, dilute the serum with two times its volume of distilled water, and add slowly the same volume of 2% trichlor-

acetic acid. Allow it to stand for 10 minutes after shaking and then filtrate it with a dry small filter paper. This filtrate is ready for the determination.

Calcium—Clark's Method (1921)

Inorganic Phosphorus—Bell and Doisy's Method (1920)

b. Calcium and Phosphate in Urine.

With great care not to let it putrify, three days urine was collected. After precipitating the salts with weak ammonia, acidify with acetic acid for the determination.

Calcium—Inoue's Method (1921)

Phosphate—Uranium Method

c. Calcium and Phosphorus in Feces.

Mix well combined three days feces in a glass mortar and use from 2.0 to 3.0 gm. of these for analysis. By Stolte's method (1911), ignite it carefully in the ordinary porcelain crucible. Then dissolve it in dilute HCl. Add weak ammonia until it becomes faintly alkaline, and then acidify it with N-HCl until faintly acid (alazalin used as indicator). Then carry out determination by the same method as in the case of urine.

RESULTS OF EXPERIMENT.

The amounts of calcium and phosphorus in three days feces of the normal and scorbutic guinea pigs are shown in tables from I to IX. The body weight, the amount of ingested food, the volume of three days urine, and the amount of feces are also shown in the same tables.

As to the calcium excretion in the urine there are two different groups of guinea pigs observable in scurvy; while one shows an increased excretion of calcium in an early period of the disease, in another its excretion decreases throughout the experiment. On the contrary, in the case of feces, it generally increases in a great amount at the beginning of scurvy, especially when the amount of calcium excretion in the urine is small. The

TABLE I.

No. 6. The Amount of Ca & P mgm in 3 days urine and feces of scorbutic guinea pigs.

			Normal	Scorbutic Days					
				3	6	9	12	15	18
Body weight		g.	570	560	540	530	490	445	395
Diet ingested		g.	56.0	56.0	60.0	55.0	37.0	48.0	63.0
Urine	Volume	cc.	32.0	40.0	25.0	22.0	13.0	19.0	72.0
	P.	mg.	60.9	67.6	56.8	51.2	27.7	23.2	24.4
	Ca	mg.	35.2	65.6	52.1	31.4	16.2	19.3	22.6
Feces	Weight	g.	7.5	5.1	7.2	7.5	7.0	5.5	2.4
	P.	mg.	76.5	50.8	107.8	69.0	71.9	46.6	45.0
	Ca	mg.	71.5	45.5	89.6	60.7	47.0	51.3	56.0
Total Amount	P.	mg.	132.4	148.4	164.6	120.2	99.6	69.8	69.4
	Ca	mg.	106.5	111.1	141.7	92.1	63.2	70.6	78.6

TABLE II.

No. 7 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbutic Guinea Pigs.

			Normal	Scorbutic Days				
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	480	460	455	410	342	290
Diet ingested		g.	61.0	55.0	73.0	38.0	10.0	7.0
Urine	Volume	cc.	35.0	37.0	23.0	26.0	31.0	23.0
	P.	mg.	61.6	50.7	49.9	36.7	41.3	43.4
	Ca	mg.	44.5	57.0	26.3	22.9	22.3	12.2
Feces	Weight	g.	8.4	8.7	11.5	4.5	2.2	0.9
	P.	mg.	63.5	100.8	112.0	55.0	33.1	11.2
	Ca	mg.	69.7	98.1	165.0	61.6	32.5	13.4
Total Amount	P.	mg.	125.1	151.5	161.9	91.7	74.4	54.6
	Ca	mg.	114.1	155.6	191.3	84.5	54.8	25.6

TABLE III.

No. 8 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbutic Guinea Pigs.

Normal				Scorbutic Days				
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	505	485	475	420	340	320
Diet ingested		g.	61.0	56.0	59.5	28.0	10.0	8.0
Urine	Volume	cc.	27.5	30.0	23.0	20.0	20.0	7.0
	P.	mg.	56.0	62.4	46.0	34.6	23.0	7.3
	Ca	mg.	45.0	36.2	29.1	21.2	7.2	1.3
Feces	Weight	g.	5.3	8.5	6.4	11.0	6.0	5.6
	P.	mg.	48.0	101.0	85.3	141.0	77.3	70.5
	Ca	mg.	40.3	95.0	77.3	127.0	67.1	63.5
Total Amount	P.	mg.	104.1	163.4	131.3	175.6	100.3	77.8
	Ca	mg.	83.2	131.2	106.4	148.2	74.3	64.8

TABLE IV.

No. 10 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbutic Guinea Pigs.

Normal				Scorbutic Days				
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	595	600	575	535	450	395
Diet ingested		g.	69.5	75.0	59.0	36.0	27.0	19.0
Urine	Volume	cc.	40.0	53.0	58.0	45.0	90.0	24.0
	P.	mg.	79.2	81.6	74.3	73.8	57.2	55.8
	Ca	mg.	51.3	59.1	45.0	46.8	21.0	6.6
Feces	Weight	g.	7.6	12.0	7.0	2.0	0	0
	P.	mg.	86.6	123.5	66.5	26.7	—	—
	Ca	mg.	94.9	154.7	83.3	31.7	—	—
Total Amount	P.	mg.	165.7	205.1	140.8	100.5	57.2	55.8
	Ca	mg.	146.3	213.8	128.3	78.5	21.2	6.6

TABLE V.

No. 14. Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbatic Guinea Pigs.

			Normal	Scorbatic Days			
				3	6	9	12
Body weight		g.	565	565	575	520	450
Diet ingested		g.	54.0	58.0	57.0	34.0	10.0
Urine	Volume	cc.	77.5	55.0	45.0	80.0	55.0
	P.	mg.	108.3	93.8	125.0	130.0	87.7
	Ca	mg.	25.2	18.2	30.4	30.6	32.4
Feces	Weight	g.	12.0	9.5	9.0	15.0	4.0
	P.	mg.	97.9	98.9	120.0	150.0	57.1
	Ca	mg.	56.6	139.7	154.4	176.3	57.6
Total Amount	P.	mg.	206.2	192.7	245.0	280.0	144.8
	Ca	mg.	131.8	157.9	184.6	206.9	90.0

TABLE VI.

No. 16 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces Scorbatic Guinea pigs.

			Normal	Scorbatic Days				
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	530	510	510	545	510	450
Diet ingested		g.	60.5	61.0	64.0	66.0	43.0	20.0
Urine	Volume	cc.	52.5	40.0	40.0	35.0	30.0	22.0
	P.	mg.	96.0	142.8	181.8	111.1	69.1	13.3
	Ca	g.	81.1	68.6	47.0	33.8	27.4	4.1
Feces	Weight	g.	8.0	6.5	9.5	8.0	7.5	2.5
	P.	mg.	110.4	117.1	128.4	90.8	119.1	35.8
	Ca	mg.	113.3	155.1	171.9	112.0	114.8	26.6
Total Amount	P.	mg.	206.4	259.9	310.2	201.9	188.1	49.1
	Ca	mg.	154.4	223.7	218.9	145.8	142.2	30.7

TABLE VII.

No. 17 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbatic Guinea Pigs.

			Scorbatic Days					
			Normal	3	6	9	12	15
Body weight		g.	620	605	565	560	490	445
Diet ingested		g.	65.5	59.0	53.0	39.0	23.0	15.0
Urine	Volume	cc.	61.5	95.0	40.0	28.0	25.0	16.0
	P.	mg.	75.9	137.2	153.9	100.0	67.1	43.5
	Ca	mg.	58.7	83.6	40.0	41.2	29.0	19.2
Feces	Weight	g.	8.8	9.0	6.5	2.5	3.0	0.7
	P.	mg.	113.2	80.3	104.4	38.5	46.9	10.9
	Ca	mg.	74.4	59.0	70.2	32.8	32.1	9.8
Total Amount	P.	mg.	189.0	217.5	258.3	138.5	114.0	54.4
	Ca	mg.	133.1	152.6	110.2	74.0	61.1	29.0

TABLE VIII.

No. 19 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feces of Scorbatic Guinea Pigs.

			Normal	Scorbutic Days				
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	560	535	540	550	480	415
Diet ingested		g.	59.0	58.0	61.0	64.0	18.0	2.0
Urine	Volume	cc.	70.0	38.0	60.0	40.0	30.0	13.0
	P.	mg.	74.1	136.4	96.2	86.2	75.0	17.5
	Ca	mg.	35.1	42.0	38.3	29.0	30.6	10.5
Feces	Weight	g.	9.3	12.0	3.0	20.0	4.5	1.5
	P.	mg.	61.4	120.0	54.9	222.2	72.6	20.6
	Ca	mg.	54.2	129.0	50.6	201.0	64.6	22.9
Total Amount	P.	mg.	135.4	256.4	151.1	308.4	147.6	38.1
	Ca	mg.	89.3	171.0	88.9	230.0	95.2	31.1

TABLE IX.

No. 20 Ca & P mgm in 3 days Urine and Feeces of Scorbatic Guinea Pigs.

			Scorbatic Days					
				3	6	9	12	15
Body weight		g.	480	455	460	455	430	370
Diet ingested		g.	52.5	43.0	44.0	46.0	25.0	2.0
Urine	Volume	cc.	52.5	55.0	37.0	28.0	23.0	17.0
	P.	mg.	68.9	93.2	85.0	60.6	51.6	11.8
	Ca	mg.	33.2	28.0	32.0	26.2	19.8	4.8
Feces	Weight	g.	8.5	5.5	2.5	7.0	8.0	3.0
	P.	mg.	84.4	63.9	27.3	87.5	96.0	25.2
	Ca	mg.	67.2	68.5	32.0	81.9	71.6	22.8
Total Amount	P.	mg.	153.3	157.1	112.3	148.1	147.6	37.0
	Ca	mg.	170.3	96.5	64.0	108.1	91.4	37.6

phosphorus excretion in almost all cases increases in urine and feces in the early period of scurvy.

The total amount of Ca and P eliminated in urine and feces shows an increase at the beginning of scurvy and then a gradual decrease.

The amount of calcium and inorganic phosphorus in the serum of scorbutic guinea pigs and the normal, are shown in tables X and XI. In the scorbutic animals, the blood for analysis is drawn in the first, second and the third weeks of scurvy.

As shown in the above tables, the amount of Ca in the serum of the normal guinea pigs are from 8.8 to 11.8 mg (on the average, 10.6 mg.) in per 100 cc. serum, and in the case of the scorbutic animals, it was from 8.5 to 11.9 mg. throughout the experiment. That is almost the same as the control.

Also inorganic phosphorus contents in the serum of the normal guinea pigs, are from 5.8 to 8.8 mg, and the average is 7.0 mg per 100 cc. serum, and that of scorbutic guinea pigs is from 3.2 to

TABLE X.

mg. of Ca per 100 cc. serum of scorbutic guinea pigs.

No. of animal	Normal	1 Week	2 Week	3 Week
1	11.8	11.2	11.9	11.6
2	11.5	11.2	11.8	11.0
3	11.4	10.8	11.6	10.2
4	11.4	10.6	11.2	10.0
5	11.0	10.6	10.9	10.0
6	10.9	10.2	10.7	10.0
7	9.7	9.2	10.4	9.8
8	9.3		9.8	8.5
9	8.8			
Average	10.6	10.5	11.0	10.1

TABLE XI.

mg. of inorg. P mgm per 100 cc. serum of scorbutic guinea pigs.

No. of animal	Normal	1 Week	2 Week	3 Week
1	8.8	8.4	8.8	10.2
2	7.7	7.6	8.7	9.5
3	7.0	6.7	8.5	7.3
4	6.7	6.3	8.1	6.0
5	6.6	5.0	7.8	3.9
6	6.5	4.8	7.7	3.8
7	5.8	4.5	6.2	3.2
8			6.1	
9			6.0	
Average	7.0	6.2	7.5	6.3

10.2 mg, on an average, is 6.7 mg per 100 cc. serum.

In 80% of scorbutic animals, the amounts do not show any difference as compared with those of the control, but in 20% of them there is a marked decrease.

As scurvy is sometimes accompanied by starvation, we determined Ca and P in the serum of the starved animals and we got results, as shown in table XII.

TABLE XII.
mg of Ca and P per 100 cc. serum of guinea pigs in starvation.

No. of animal	1	2	3	4	5	6	7	Average
Calcium	11.0	11.0	10.4	10.0	9.8	9.0	9.0	10.1
Inorganic phosphor	8.9	8.5	7.8	6.9	6.3	5.9	5.1	7.1

According to the above results, the amounts of Ca in the serum per 100 cc., are from 9.0 to 11.0 mg and the average is 10.1 mg. The amounts of P are from 5.1 to 8.9 mg and the average is 7.1 mg. These do not differ from the normal animals.

SUMMARY.

The amounts of Ca and P eliminated in urine and feces of the scorbutic guinea pigs in our experiment, though seemed to be affected somewhat by the amount of the ingested food, increase generally in the early period of scurvy, with the tendency to decrease toward the end. Whenever the urinary excretion of Ca decreases, a large amount of calcium is found in the feces. Ca content in the serum of our scorbutic guinea pigs, just as Euler, Myrbäck, Edestein and Schmal reported, does not differ from the normal. The amount of P in the serum remains in a majority of cases, almost the same as in the normal, coinciding with what

Edestein and Schmal reported. We cannot agree with Euler and Myrbäck in that the amounts of phosphate in the serum of the scorbutic guinea pigs decrease considerably so that the diminution of P in the serum might be taken as a "Quantitatives Kriterium" of scurvy.

REFERENCES.

- Bell and Dorsy (1920): Journ. Biol. Chem., **44**, 55.
Clark (1921): Journ. Biol. Chem., **48**, 223.
Edestein and Schmal (1926): Z. Kinderheilk., **41**.
v. Euler, Hans u. Myrbäck Karl (1925): Hoppe-Seyler's Z., **148**, 190.
Inouye, T. (1921): Tokyo Igakkai Zasshi, **36**, No. 4.
Nagayama, Maehida and Takeda (1928): J. of Biochem., **10**, 17.
Stolte (1911): Biochem. Z., **35**, 104.
Tomita, K. (1928): Sci-I-Kwai Med. J., No. 511.

Additional writing:

The subsidy for natural science in the Educational Department was applied to expense of this study.

